

Université de Montréal

**Modulation de la signalisation du récepteur de type 2 du  
facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
(VEGFR-2) par l'ubiquitination.**

par

Rosemberg Ramos Gueto

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Pharmacologie

Avril, 2011

© Rosemberg Ramos Gueto, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Modulation de la signalisation du récepteur de type 2 du facteur de croissance de  
l'endothélium vasculaire (VEGFR-2) par l'ubiquitination

Présenté par :  
Rosemberg Ramos Gueto

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Rousseau, président-rapporteur  
Jean-Philippe Gratton, directeur de recherche  
Jean-François Côté, membre du jury

## Résumé

L'angiogenèse est l'un des processus les plus importants pour le maintien de l'homéostasie de l'oxygène dans les tissus. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF, joue un rôle primordial dans la réponse angiogénique. Ce facteur de croissance mène à l'activation du récepteur de type 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGFR-2. Suite à une activation du VEGFR-2, plusieurs cascades de signalisation sont activées dans les cellules endothéliales. Afin d'atténuer cette signalisation, le VEGFR-2 est multi-ubiquitiné sur des résidus lysine et de cette manière, il est amené aux voies de dégradation, principalement dans les lysosomes. Cette ubiquitination est induite par l'association de l'ubiquitine ligase (E3) c-Cbl à un résidu tyrosine phosphorylé du domaine C-terminal du récepteur.

Dans cette étude, nous avons identifié la tyrosine 1319 comme étant nécessaire pour l'association de c-Cbl au VEGFR-2 et son ubiquitination. Nos résultats démontrent aussi que dans des cellules endothéliales aortiques bovines, BAEC, la surexpression du récepteur mutant Y1319F ralentit la dégradation du VEGFR-2 et induit une activation plus forte et prolongée de la synthétase endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS). Ces résultats nous permettent de mieux comprendre le déroulement de la régulation de la signalisation du VEGFR-2 au niveau intracellulaire.

**Mots-clés:** [Angiogenèse, VEGFR-2, VEGF, c-Cbl, Ubiquitination, Tyrosine 1319, Dégradation]

## **Abstract**

Angiogenesis is one of the most important processes to maintain oxygen homeostasis throughout the different tissues. The different signaling pathways of the vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR-2, play a primordial role in the angiogenic response induced by different angiogenic factors, one of which is the vascular endothelial growth factor, VEGF. Following VEGFR-2 activation, many signaling cascades are triggered in endothelial cells; in order to attenuate this response, VEGFR-2 undergoes multi ubiquitination on lysine residues and in this fashion it is brought into the degradation pathways, mainly through the lysosomes. This ubiquitination is induced by the association of the ubiquitin ligase (E3) c-Cbl to a phosphorylated tyrosine residue in the c-terminal domain of VEGFR-2.

In this study, we identified tyrosine residue 1319 as being necessary for the association of c-Cbl to VEGFR-2 and for its ubiquitination. Our results show as well that overexpression of the mutant Y1319F version of VEGFR-2 in bovine aortic endothelial cells, BAEC, slows down the degradation process of VEGFR-2 and at the same time increases and prolongs the activation of endothelial nitric oxide synthase, eNOS. These results allow us to better understand the process of VEGFR-2 signaling regulation at the intracellular level.

**Keywords:** [Angiogenesis, VEGFR-2, VEGF, c-Cbl, Ubiquitination, Tyrosine 1319, Degradation]

# Table des matières

RÉSUMÉ .....	i
ABSTRACT.....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vi
REMERCIEMENTS.....	ix
 <b>1 Introduction</b>	
1.1 Angiogenèse.....	2
1.1.1 L'Angiogenèse Physiologique.....	3
1.1.2 L'Angiogenèse Pathologique .....	5
1.2 La famille des VEGFs.....	7
1.2.1 Le VEGF-A.....	7
1.2.2 Le VEGF-B et le PlGF.....	9
1.2.3 Les VEGF C et D.....	10
1.2.4 Les VEGF-E et F .....	10
1.3 Les récepteurs du VEGF .....	11
1.3.1 Le VEGFR-1 .....	11
1.3.2 Le VEGFR-2.....	12
1.3.3 Le VEGFR-3.....	16
1.3.4 Neuropilines, Integrines et VE-cadherines .....	17
1.3.5 Rôle et régulation d'eNOS.....	18
1.4 La Régulation des Récepteurs Tyrosine Kinases (RTKs).....	21
1.4.1 Régulation du trafic intracellulaire et de la signalisation du VEGFR-2 .....	25
1.5 L'Ubiquitine Ligase (E3) c-Cbl .....	27
1.6 Hypothèse du Projet et objectif.....	32
 <b>2 Matériel et méthodes</b> .....	34
2.1 Construction des plasmides, mutagenèses et clonage.....	35
2.2 Transfections, Immunoprécipitations, et Immunobuvardages.....	36

2.2.1 Culture Cellulaire.....	36
2.2.2 Essais d'ubiquitination.....	36
2.2.3 Essais d'association de c-Cbl au VEGFR-2.....	37
2.2.4 Essais de cinétique de dégradation du VEGFR-2.....	38
2.3 Anticorps.....	38
<b>3 Résultats</b> .....	39
3.1 L'activité kinase du VEGFR-2 est nécessaire pour l'ubiquitination induite par c-Cbl. .....	40
3.2 La queue C-terminal du VEGFR-2 est essentielle pour l'induction de l'ubiquitination par c-Cbl.....	42
3.3 Le rôle des tyrosines 1305, 1309, et 1319 dans l'ubiquitination du VEGFR-2. ....	44
3.4 La Tyrosine 1319 est nécessaire pour l'ubiquitination du VEGFR-2. ....	46
3.5 La surexpression du mutant Y1319F dans les cellules BAEC ralenti la dégradation du VEGFR-2 et prolonge sa signalisation. ....	48
<b>4 Discussion</b> .....	50
<b>5 Perspectives futures</b> .....	57
<b>6 Conclusion</b> .....	59
<b>7 Bibliographie</b> .....	60

# Liste des figures

## Introduction

**Figure 1.1.** Spécificités de liaison des différents ligands de VEGF et leurs récepteurs...8

**Figure 1.2.** Mécanisme d'activation du VEGFR-2 par le VEGF-A, les différentes voies de signalisation amènent à la survie, la perméabilité, la migration, et la prolifération des cellules endothéliales .....13

**Figure 1.3.** Vue générale du mécanisme de l'ubiquitination d'une protéine et voie enzymatique de la conjugaison de l'ubiquitine.....23

**Figure 1.4.** La famille des ubiquitine ligases Cbl chez les mammifères.....29

## Résultats

**Figure 3.1.** L'activité kinase du VEGFR-2 est nécessaire pour l'ubiquitination induite par c-Cbl. ....41

**Figure 3.2.** Le domaine C-terminal du VEGFR-2 est nécessaire pour son ubiquitination. ....43

**Figure 3.3.** L'effet des doubles mutants sur l'ubiquitination du VEGFR-2 et association de c-Cbl. ....45

**Figure 3.4.** La Tyrosine 1319 est nécessaire pour l'ubiquitination du VEGFR-2.....47

**Figure 3.5.** La surexpression du mutant Y1319F ralenti la dégradation du VEGFR-2 et prolonge sa signalisation.....49

## Discussion

**Figure 4.1** Comparaison des séquences entourant les tyrosines nécessaires pour l'association de c-Cbl et l'ubiquitination des récepteurs VEGFR-1 et 2.....53

**Liste d'abréviations**

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ANG-1: Angiopoietine 1

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine Triphosphate

BAEC: Cellules Endothéliales Aortiques Bovines

Cbl: 'Casitas B-lineage Lymphoma'

Cdc42: 'Cell Division Control Protein 42'

c-GMP: 'cyclic GMP'

COS: 'CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material'

CSF: 'Colony Stimulating Factor'

EGFR: 'Endothelial Growth Factor Receptor'

eNOS: 'Endothelial Nitric Oxide Synthase'

Erk: 'Extracellular signal Regulated Kinase'

ESCRT: 'Endosomal Sorting Complex Required for Transport'

F: Phénylalanine

FAK: 'Focal Adhesion Kinase'

GTP: Guanosine Triphosphate

FGF: 'Fibroblast Growth Factor'

HGF: 'Hepatocyte Growth Factor'

HIF: 'Hypoxia-Inducible Factor'

HSP-90: 'Heat Shock Protein 90'

IR: 'Insulin Receptor'



K: Lysine

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase'

MMP-1: 'Matrix Metalloproteinase 1'

MVB: 'Multi Vesicular Bodies'

NADPH: 'Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate'

Nck: 'Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1'

NK: 'Natural Killer' (Cellules)

NRP: Neuropiline

Orf: 'Open Reading Frame'

PDGF: 'Platelet Derived Growth Factor'

PI3K: 'Phosphoinositide 3-kinase'

PKC: 'Protein Kinase C'

PLC $\gamma$ : 'Phospholipase C gamma'

PlGF: 'Placenta Growth Factor'

Raf: 'Ras Associated Factor'

RTK: Récepteur Tyrosine Kinase

SH2-3: 'Src Homology domain 2-3'

Shb: 'SH2 domain-containing adapter protein B'

Spry 2: 'Sprouty 2'

TKB: 'Tyrosine Kinase Binding Domain'

TSAd: 'T-cell Specific Adaptor protein'

UBD (UID-M): 'Ubiquitin Binding Domain'

VEGF: 'Vascular Endothelial Growth factor'

VEGFR: 'Vascular Endothelial Growth Factor Receptor'

VRAP: 'VEGF Receptor Associated Protein'

VSMC: 'Vascular Smooth Muscle Cell'

Y: Tyrosine

## **Remerciements**

J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche, le Dr Jean-Philippe Gratton, non seulement pour l'opportunité de me laisser effectuer mes travaux de maîtrise dans son laboratoire, mais aussi pour son support continu, sa patience et ses très précieux conseils. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire, spécialement Chantal Delisle pour le support reçu pendant la durée de mon projet. Je suis aussi très reconnaissant envers Malika Oubaha, Fanny Desjardins, Sébastien Thibeault et Yoann Rautureau.

Je remercie aussi les membres de ma famille pour leur soutien moral et pour l'inspiration qu'ils m'ont apportés pour compléter mes études.

# **1 Introduction**

## **1.1 L'angiogenèse**

Les vaisseaux sanguins forment un réseau complexe ayant pour rôle de transporter le sang et les nutriments partout dans le corps. La création et la maintenance de ce réseau sanguin ont une grande importance physiologique, car de sérieuses maladies peuvent survenir quand ces processus ne fonctionnent pas normalement.

L'angiogenèse, ou la croissance des nouveaux vaisseaux sanguins, est un processus biologique très important lors du développement embryonnaire, et il s'agit d'un des événements les plus primaires de l'organogenèse [1]. À l'âge adulte, l'angiogenèse joue également un rôle très important dans la fermeture des plaies et la restauration du flux sanguin vers les tissus endommagés [2]. L'angiogenèse est strictement contrôlée par un ensemble de facteurs de croissance et d'inhibiteurs, et le déséquilibre entre les deux mène très souvent à des conditions pathologiques [3]. L'excès d'angiogenèse conduit à une augmentation du flux sanguin dans le tissu malade en affectant en même temps le tissu sain, comme par exemple dans le cancer, le diabète et l'arthrite rhumatoïde [4]. Dans le cas opposé, une angiogenèse insuffisante peut entraîner des maladies telles que les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux, et une cicatrisation retardée. Toutes ces conditions sont conséquentes d'une croissance faible des vaisseaux sanguins entraînant ainsi une mauvaise circulation du sang et éventuellement la mort du tissu.

### **1.1.1 L'angiogenèse physiologique**

Le système cardiovasculaire est le premier organe à se développer et à atteindre un état fonctionnel chez l'embryon. Pendant l'angiogenèse, le plexus capillaire est remodelé par le bourgeonnement, la croissance microvasculaire et la fusion pour former un lit vasculaire fonctionnel [5]. L'angiogenèse est dépendante d'une interaction stricte entre les cellules endothéliales, les péricytes et les cellules stromales, et cet ensemble a besoin d'interagir à son tour avec la matrice extracellulaire et la membrane basale vasculaire [6]. Chez les adultes, l'angiogenèse est nécessaire pour l'homéostasie des différents processus physiologiques tels que la fermeture des plaies, l'inflammation et la croissance de l'endomètre pendant le cycle menstruel. Elle sert aussi à maintenir l'intégrité des tissus pendant l'ischémie ou les greffes de tissus.

De multiples étapes séquentielles sont nécessaires pour une angiogenèse efficace. Le premier pas vers une région non vascularisée est la création d'un gradient chimiotactique, très souvent à l'aide du puissant facteur pro-angiogénique et mitogène, le VEGF [7]. Ce gradient conduit à la formation d'une cellule de pointe (tip cell) très mobile, derrière laquelle la prolifération de cellules tige (stalk cells) va former une pousse d'un nouveau vaisseau [8]. Les cellules de pointe adoptent un phénotype protéolytique et commencent alors à dégrader la membrane basale [9], les cellules perdent ainsi leurs contacts avec la laminine de la membrane basale et sont exposées au collagène interstitiel. Ce changement aide à générer des signaux intracellulaires dans les cellules endothéliales qui a comme résultats la réorganisation du cytosquelette et une morphogenèse de type par bourgeonnement [10]. La métalloprotéinase membranaire de type 1 (MMP-1) est sécrétée

par la cellule de pointe d'une repousse endothéliale et digère la matrice tout autour. Les niveaux de cette métalloprotéinase sont réprimés quand les cellules tiges (stalk cell) entrent en contact avec les péricytes. Cette même métalloprotéinase exprimée à la surface des cellules endothéliales est aussi nécessaire pour les étapes subséquentes de l'angiogenèse, puisqu'elle a un rôle dans la formation des vacuoles endothéliales intracellulaires et le lumen endothélial [11]. Le VEGF induit également, dans les cellules tiges endothéliales, l'activation du récepteur notch1 et du récepteur notch4, cette activation agit comme un mécanisme d'atténuation pour prévenir une angiogenèse exagérée et promouvoir le développement organisé des nouveaux vaisseaux formés [12]. Cette phase de résolution signale l'arrêt de la prolifération des cellules endothéliales et le recrutement de péricytes et de cellules vasculaires lisses [13].

Une étape cruciale de l'angiogenèse est le recrutement de péricytes vers la nouvelle branche microvasculaire. Ces cellules, considérées comme l'équivalent fonctionnel des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), sont essentielles pour la maturation des tubules endothéliaux vers des vaisseaux sanguins [12]. Ces péricytes, provenant des artérioles et des cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse, sont recrutés par les cellules endothéliales qui secrètent le facteur de croissance dérivé des plaquettes BB (PDGF-BB). Les péricytes à leur tour expriment l'Angiopoietine 1 (ANG1) à leur surface qui lie le récepteur Tie2 exprimé par les cellules endothéliales [14], cette activation de Tie2 conduit à la stabilisation du vaisseau vasculaire. Une fois la formation du tube vasculaire complétée, le sang circule vers la nouvelle aire vascularisée et les niveaux d'oxygène augmentent ce qui fait baisser les niveaux de VEGF et l'angiogenèse prend fin [15].

### **1.1.2 L'angiogenèse pathologique**

L'angiogenèse pathologique suit presque les mêmes étapes du processus de l'angiogenèse physiologique. L'ischémie et les conditions hypoxiques initient une cascade de fonctions cellulaires qui ont comme but l'établissement des nouveaux vaisseaux vasculaires pour le rétablissement du flux sanguin et la présence de l'oxygène. Mais à l'opposé de l'angiogenèse physiologique, dans l'angiogenèse pathologique telle que la tumorigenèse, la cascade des signaux angiogéniques est persistante et non résolue [16]. Les vaisseaux tumoraux sont plus désorganisés et moins performants, et sont également plus perméables que les vaisseaux normaux, ce qui génère de l'hypertension interstitielle et limite la distribution des drogues vers les cellules tumorales [17]. Un microenvironnement hypoxique mène à une augmentation de la production des facteurs inductibles par l'hypoxie (HIFs) et ceux-ci mènent à l'activation de l'angiogenèse [18]. Pour assurer leur oxygénation et par conséquent leur croissance, les cellules tumorales ont développé différentes techniques pour mimer un état d'hypoxie; en faisant ceci une réponse angiogénique est générée, ce qui mène au développement de nouveaux vaisseaux sanguins pour l'oxygénation des cellules tumorales. La mutation de différents oncogènes et l'augmentation de la signalisation par les facteurs de croissance conduit à l'activation des kinases comme MAPK, PI3K, ou la protéine kinase C (PKC) et mène à une induction de l'activité des HIFs [19]. Plusieurs cancers augmentent aussi excessivement l'expression du VEGF-A, ce que de manière autocrine, facilite la prolifération et la survie des cellules cancéreuses et contribue à l'invasion des tumeurs [20].



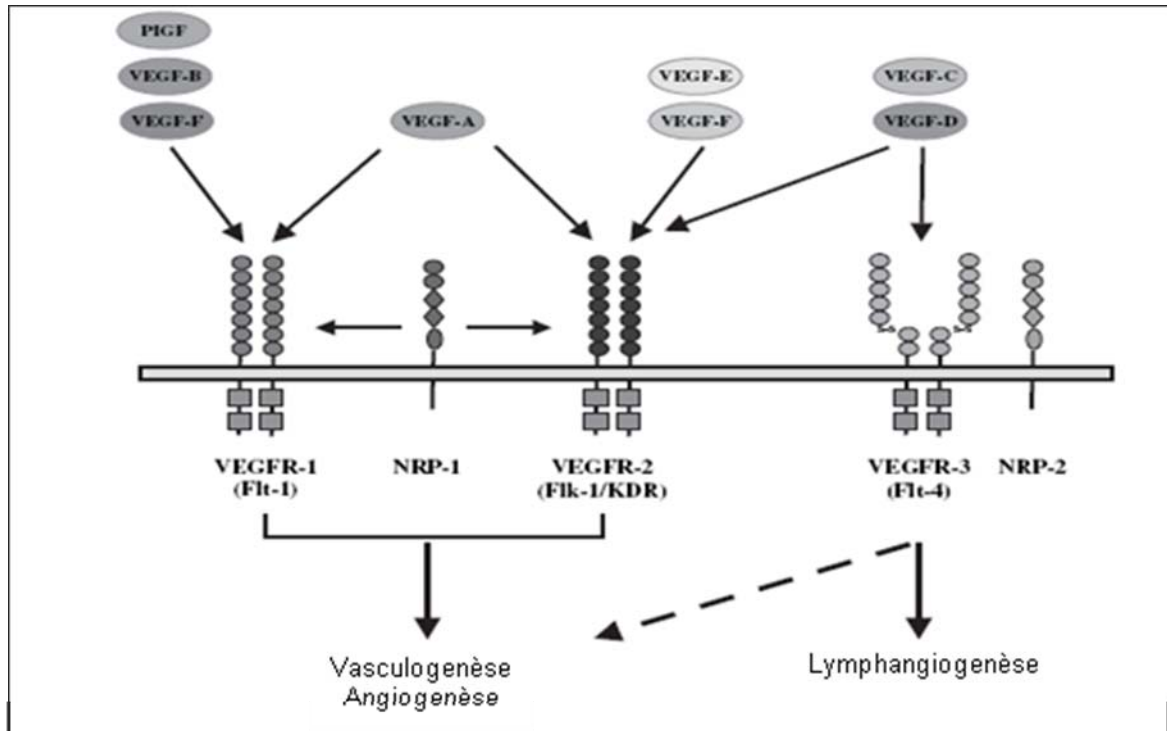
Le stroma des tumeurs joue aussi un rôle très important dans la survie et la prolifération des cellules tumorales. Le stroma des tumeurs épithéliales par exemple, en sécrétant des quantités anormales de VEGF-A, peut promouvoir l'activation d'une pseudoréponse de fermeture de plaies, qui est non contrôlée et très souvent mène à l'invasion et aux métastases [21]. Les fibroblastes et les cellules inflammatoires infiltrantes, tels que les macrophages et les mastocytes, sont deux exemples des cellules du stroma les plus étudiés dans la survie des tumeurs. La dérégulation de différents facteurs angiogéniques et de médiateurs de l'angiogenèse ne se limite pas aux tumeurs solides, mais aussi à différentes maladies hématologiques telles que la leucémie et certains lymphomes [22]. Une expression exagérée des VEGFR-1 et 2 a été détectée dans la plupart de leucémies, et dans la moelle osseuse une surexpression de VEGF-A, par des précurseurs myéloïdes malins, a été également observée [23]. Au niveau de l'œil, une production excessive de VEGF-A, causée par l'hypoxie et une activation non-contrôlée des astrocytes, peut aussi conduire à une néo-vascularisation exagérée, ce qui peut entraîner des hémorragies vitreuses, un détachement de la rétine, des glaucomes et dans les cas les plus graves la cécité [24]. En même temps, la régulation à la hausse du VEGF peut mener aussi à des maladies inflammatoires de la peau tel que le psoriasis, à de l'arthrite [25] [26], de l'œdème cérébral et au rejet des greffes en augmentant l'infiltration des cellules T [27].

## 1.2 La famille des VEGFs

Chez les mammifères, la famille des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGFs est composée de cinq glycoprotéines qui sont le VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance du placenta (PlGF) [28]. Deux autres homologues du VEGF, VEGF-E et F, ont été découverts dans le génome du parapoxvirus ORF (ORFV) et dans le venin de plusieurs types de serpents respectivement [29] [30]. Les VEGFs lient et activent trois récepteurs tyrosine kinase de type III, appelés récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 1,2, et 3 (VEGFRs). Les VEGFs ont une spécificité distincte d'association à chacun de ces récepteurs ce qui contribue à la diversité de leurs fonctions [31] (Figure 1.1).

### 1.2.1 VEGF-A

Le gène du VEGF-A est localisé sur le chromosome 6 et il est codé par huit exons [32]. Le gène du VEGF-A subit de l'épissage alternatif ce qui génère différents isoformes de 121, 145, 165, 183, 189, et 206 acides aminés. Les patrons d'expression des différents isoformes du VEGF-A sont spécifiques pour chaque tissu où ils sont exprimés, ce qui rend leurs fonctions très définies pendant la vasculogenèse et l'angiogenèse [33]. Le VEGF-A est essentiel pour la vasculogenèse pendant le développement. Les délétions homozygotes ou hétérozygotes chez la souris sont létales pour l'embryon à cause des anomalies vasculaires générées [34]. Il a été démontré que l'isoforme 165 du VEGF-A est surexprimé dans plusieurs types de tumeurs solides, des maladies hématologiques et qu'il est essentiel dans le développement de l'angiogenèse tumorale [35]. Cette importance dans l'angiogenèse



**Figure 1.1.** Spécificités de liaison des différents ligands de VEGF et leurs récepteurs. (Adapté de Hicklin, D.J. Cancer Drug Discovery and Development, 2008).

tumorale a pu être établie par des études qui démontrent l'inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale par des inhibiteurs du VEGF-A, tels que des anticorps monoclonaux anti-VEGF-A et des formes solubles des récepteurs pour le VEGF [36]. Actuellement, des anticorps monoclonaux tels qu'Avastin® (bevacizumab), sont de plus en plus utilisés pour le traitement de plusieurs types de cancers, incluant le cancer colorectal, le cancer des reins et le glioblastome [37].

### **1.2.2 VEGF-B et le PlGF**

Le gène du VEGF-B est localisé sur le chromosome 11 et il contient huit exons [38]. Il peut être produit en isoformes de 167 ou 187 acides aminés. Il lie spécifiquement le VEGFR-1 et le corécepteur Neuropilin1 (NRP-1). Le rôle du VEGF-B pendant le développement et l'angiogenèse n'est pas complètement élucidé. Les souris déficientes en VEGF-B développent des cœurs plus petits que les souris normales mais leur état de santé et de fertilité ne sont pas affectés [39]. Les souris déficientes en VEGF-B démontrent aussi de la dysfonction vasculaire après une occlusion coronarienne et une récupération diminuée après une ischémie cérébrale ou myocardique [40].

Le PlGF quand à lui se trouve sur le chromosome 14 et est codé par sept exons [32]. Quatre isoformes ont été identifiés, 1, 2, 3 et 4, et ils lient tous exclusivement le VEGFR-1. L'expression du PlGF a été identifiée premièrement dans le placenta, et par la suite dans le cœur et les poumons [41]. Le PlGF joue un rôle très important dans l'arteriogenèse en induisant indirectement la survie des cellules endothéliales par une régulation à la hausse du VEGF-A [42]. Les souris déficientes en PlGF sont viables mais ont une réponse

angiogénique diminuée, beaucoup d'inflammation, et un processus de fermeture de plaies altéré, ce qui suggère un rôle pour le PlGF dans diverses pathologies [43].

### **1.2.3 VEGF-C et VEGF-D**

Les gènes du VEGF-C et D se localisent sur les chromosomes 4 et X respectivement [38] [44]. Ils jouent un rôle clé pendant la lymphangiogenèse embryonnaire et postnatale. Par exemple, les délétions homozygotes du VEGF-C chez la souris sont létales et les hétérozygotes sont associés avec un développement défectueux du système lymphatique [45]. Les VEGF-C et D participent également à la croissance des tumeurs en induisant la formation de vaisseaux lymphatiques ce qui aurait un effet sur les métastases au niveau des ganglions lymphatiques [46]. Dans des modèles précliniques, en utilisant des inhibiteurs solubles pour le VEGFR-3, un blocage spécifique de la lymphangiogenèse tumorale induite par le VEGF-C a été obtenu [47]. De plus, en utilisant des ARNs interférants pour diminuer la production de VEGF-C, la lymphangiogenèse et les métastases ont été inhibés [48].

### **1.2.4 VEGF-E et VEGF-F**

Le VEGF-E est une protéine virale codée par le parapoxvirus ORF (ORFV) nécessaire pour l'infection chez les moutons et les chèvres. Il partage approximativement 22% de la séquence du VEGF-A et se lie préférentiellement au VEGFR-2 et à la NRP-1 pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire [29]. Le VEGF-F, récemment identifié dans le venin de plusieurs types de serpents, partage la même séquence que le VEGF-A à 50% et il lie aussi le VEGFR-2, mais son rôle dans l'angiogenèse reste à être identifié [30].

### 1.3 Les récepteurs du VEGF

Les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGFs, exercent leurs fonctions biologiques de façon très sélective par la liaison et l'activation de trois récepteurs tyrosine kinase de type III, soient les récepteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire 1, 2 et 3 (VEGFR-1, 2 et 3). Les VEGFR-1 et 2 ont été initialement identifiés dans les cellules endothéliales, mais ils sont exprimés aussi dans différentes lignées cellulaires hématopoïétiques chez l'adulte. Ils partagent 44% d'homologie dans leurs séquences et possèdent une structure caractéristique composée de sept domaines extracellulaires de type immunoglobuline, un simple domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase divisé en deux segments par une séquence de 70 acides aminés [49] [50]. Le VEGFR-3, cloné à partir d'une lignée cellulaire leucémique humaine, est différent structuralement des VEGFR-1 et 2 puisqu'il subit une modification protéolytique dans le domaine extracellulaire et forme deux sous-unités tenues ensemble par un lien disulfure [51].

#### 1.3.1 Le VEGFR-1

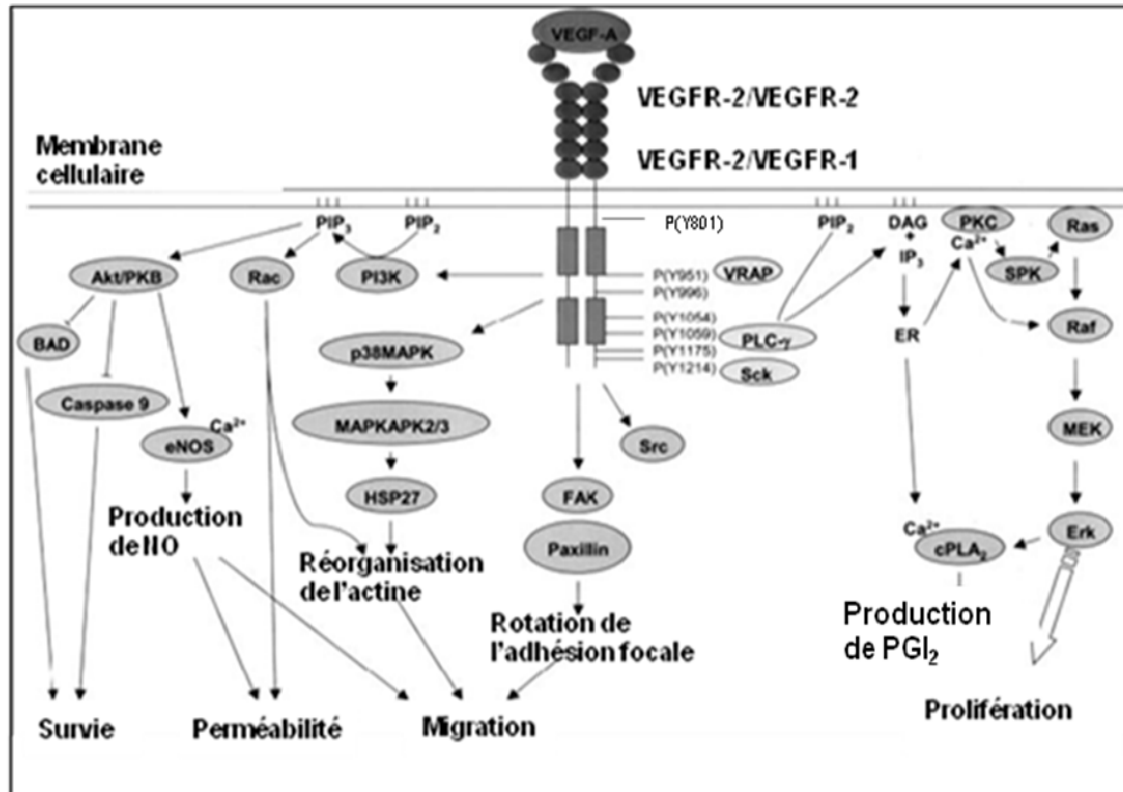
Le VEGFR-1 est un récepteur pour toutes les isoformes du VEGF-A, mais il est spécifique pour le VEGF-B et PlGF. Il est exprimé dans les cellules endothéliales, hématopoïétiques et les cellules lisses vasculaires [52]. Le VEGFR1 est essentiel pour la vasculogenèse pendant le développement embryonnaire, car les souris déficientes en VEGFR-1 meurent *in utero* en raison d'une prolifération excessive des hémangioblastes et une faible organisation des structures vasculaires [53]. La stimulation de l'autophosphorylation et la signalisation du VEGFR-1 induite par le VEGF est faible comparée à celle du VEGFR-2 [54] et malgré son rôle important dans le développement, sa fonction précise dans l'angiogenèse et

l'hématopoïèse reste sous investigation. Initialement, il a été proposé que le VEGFR-1 agisse comme un régulateur négatif en fonctionnant comme un récepteur piègeur pour le VEGF ou en régulant à la baisse la signalisation du VEGFR-2 [55]. Certaines études ont démontré que lors de conditions pathologiques, comme la tumorigenèse, le VEGFR-1 est un puissant stimulateur de l'angiogenèse [56]. D'un autre côté il possède des rôles fonctionnels dans d'autres types de cellules comme par exemple lors de la migration de monocytes, l'adhérence des cellules tueuses naturelles (NK cells) et le recrutement des progéniteurs de cellules endothéliales [57] [58] [59]. Donc, la fonction du VEGFR-1 varie avec les étapes du développement, les états physiologiques et le type de cellule dans lequel il est exprimé.

### 1.3.2 Le VEGFR-2

Le VEGFR-2 est considéré comme étant le principal médiateur de la fonction du VEGF-A dans l'angiogenèse et la vasculogenèse et il est exprimé dans les cellules endothéliales, les cellules hématopoïétiques et les neurones. Les souris 'knock-out', soient homozygotes ou hétérozygotes pour le VEGFR-2 meurent *in utero* en raison des défauts dans la formation d'îlots sanguins et dans le développement vasculaire [60]. Le VEGFR-2 est aussi le principal récepteur du VEGF-A pour induire non seulement la perméabilité vasculaire mais aussi la prolifération, l'invasion, la migration et la survie des cellules endothéliales pendant l'angiogenèse [61] [62].

La dimérisation du VEGFR-2 induite par le VEGF-A génère l'autophosphorylation des différents résidus tyrosines dans le domaine intracellulaire du récepteur (Figure 1.2). Il existe deux types d'autophosphorylation, *cis* et *trans*. Dans l'autophosphorylation *cis*, un



**Figure 1.2.** Mécanisme d'activation du VEGFR-2 par le VEGF-A, les différentes voies de signalisation amènent à la survie, la perméabilité, la migration, et la prolifération des cellules endothéliales. (Adapté de Hoeben, A et al. Pharmacology Reviews. 2004.)



récepteur catalyse sa propre phosphorylation; dans le cas de l'autophosphorylation trans, un récepteur du dimer serve comme l'enzyme pendant que l'autre récepteur serve comme substrat, et vice versa [63]. L'autophosphorylation cis est indépendante de la concentration de l'enzyme, pendant que la trans est dépendante de la concentration de l'enzyme. L'autophosphorylation du VEGFR-2 se produit d'une manière trans car elle est dépendante de la concentration de l'enzyme [64]. Dans le cas du VEGFR-2, un domaine kinase formé par 70 acides aminés crée des séquences consensus pour le recrutement spécifique de protéines intracellulaires. Le domaine tyrosine kinase du VEGFR-2 catalyse la réaction nécessaire pour le transfert d'un groupe phosphate vers la protéine ciblée en présence du magnésium [63]. Les résidus tyrosines 951, 1054, et 1059 ont été identifiés dans un système d'expression bactérienne comme étant les cibles de l'autophosphorylation [65]. D'autres études d'expression chez le baculovirus ont identifié les tyrosines 801 et 1175 comme étant aussi phosphorylées [66] et plus récemment, la tyrosine 1214 chez des cellules mammifères stimulées au VEGF-A [67]. La phosphorylation de ces résidus crée une séquence de consensus pour le recrutement des protéines intracellulaires spécifiques via leurs domaines d'homologie Src 2 (SH2). Par exemple, la phosphorylation de la tyrosine 951 sert de site de liaison pour la protéine associée au récepteur du VEGF (VRAP) aussi appelée TSA<sub>d</sub> ou molécule adaptatrice spécifique pour les cellules T et elle a un rôle dans la réorganisation de l'actine et la migration [68]. Les tyrosines 1054 et 1059 présentes dans la boucle d'activation du récepteur sont nécessaires pour l'activité catalytique du VEGFR-2 [69]. La tyrosine 801 est importante dans la perméabilité induite par le VEGF-A, car sa phosphorylation permet le recrutement et active directement la sous-unité p85 de la

phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la kinase Akt ce qui induit la production du monoxyde d'azote par la synthétase endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS) [70].

La prolifération des cellules endothéliales implique l'activation de la cascade de signalisation de PLC  $\gamma$ , de la protéine kinase C (PKC), de Raf et d'Erk suite à une transactivation du récepteur et de la phosphorylation de la tyrosine 1175 [71]. La liaison de PLC  $\gamma$  à la tyrosine 1175 mène à l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> ce qui génère les messagers secondaires DAG et IP<sub>3</sub>. DAG est l'activateur physiologique de PKC, pendant qu'IP<sub>3</sub> agit sur des récepteurs présents sur le réticulum endoplasmique ce qui mène à la libération du calcium intracellulaire [67]. Ce calcium intracellulaire mène à une induction de la production de PGI<sub>2</sub> et à l'expression de gènes nécessaires pour la prolifération. La survie cellulaire et la migration sont contrôlées par les voies de la PI3K et de la kinase d'adhésion focale (FAK) par le recrutement et l'activation de la protéine adaptatrice Shb au résidu 1175 respectivement [72]. Cette activation mène à la production de PIP<sub>3</sub> nécessaire pour l'activation d'AKT et la survie de cellules. D'un autre côté, l'activation de Shb mène à l'activation de FAK et la rotation de l'adhésion focale nécessaire pour la migration. La phosphorylation de la tyrosine 1214 crée un site de liaison pour la protéine adaptatrice Nck et mène à son activation. Cette activation déclenche la voie de signalisation Cdc42 et p38 MAPK nécessaire pour la réorganisation du cytosquelette et la migration des cellules endothéliales.

Une activation spécifique du VEGFR-2 avec le VEGF-E, qui lie préférentiellement le VEGFR-2 et la Neuropiline 1, génère une forte stimulation des cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro*, ce qui confirme la capacité du VEGFR-2 d'induire l'angiogenèse par lui-

même en induisant la prolifération des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire. La co-expression du VEGFR-1 peut aussi avoir une influence positive ou négative sur l'activité du VEGFR-2 [73]. L'activation du VEGFR-1 par le PlGF, mène à la transphosphorylation du VEGFR-2 dans des cellules endothéliales co-exprimant les deux récepteurs [73]. De la même façon, une version soluble du VEGFR-1 a été reconnue comme inhibitrice de l'activité du VEGF en le séquestrant et en prévenant sa liaison au VEGFR-2 [74].

Plusieurs approches sont utilisées pour contrer l'activité du VEGFR-2 dans l'angiogenèse tumorale, dans la croissance primaire des tumeurs et des métastases. Par exemple, des inhibiteurs de l'activité kinase du récepteur et des anticorps monoclonaux qui neutralisent le récepteur sont utilisés, ce qui a pour résultat une diminution de la prolifération des tumeurs, de la densité microvasculaire et une augmentation de la nécrose tumorale et de l'apoptose [75] [76].

### **1.3.3 Le VEGFR-3**

Le VEGFR-3 a été cloné à partir d'une lignée cellulaire de leucémie humaine et d'une lignée du placenta humain [77]. Il lie préférentiellement le VEGF-C et D et son expression est limitée aux cellules endothéliales lymphatiques. Par contre dans certaines conditions pathologiques, tel que le cancer, il peut être exprimé dans les vaisseaux sanguins tumoraux [78]. Chez les adultes, l'expression du VEGFR-3 est associée à la lymphangiogenèse lors de la fermeture de plaies [79]. Il est aussi impliqué dans le développement cardiovasculaire et le remodelage des réseaux vasculaires primaires pendant l'embryogenèse en modulant la signalisation du VEGFR-2 [80]. La régulation à la hausse de l'activation du VEGFR-3 et

de ses ligands (VEGF-C et D) a été observée dans plusieurs types de cancers et cette augmentation a été reliée avec le développement de métastases au niveau des ganglions lymphatiques des patients [81]. L'inhibition du VEGFR-3 avec un anticorps monoclonal neutralisateur dans un modèle murin réduit non seulement l'incidence de métastases de cellules cancéreuses vers les ganglions lymphatiques et autres tissus, mais aide aussi à réduire l'hyperplasie lymphatique [82] [83].

#### **1.3.4. Neuropilines, intégrines et VE-cadherines**

Les Neuropilines 1 et 2 (NRP-1 et 2) sont des glycoprotéines sur la surface cellulaire qui ne contiennent pas de domaine de signalisation intracellulaire. Elles servent de corécepteurs pour le VEGF avec les VEGFR-1 et 2 et augmentent l'affinité de la liaison du VEGF aux récepteurs [84]. La liaison du VEGF-A à la NRP-1 est très spécifique et l'inhibition de cette dernière dans les cellules endothéliales mène à une diminution de la liaison au VEGFR-2 et une diminution de son activité mitogénique [85]. Les souris déficientes en NRP-1 ont des défauts létaux dans le développement vasculaire et neuronal et des effets similaires peuvent aussi être observés chez des souris déficientes en NRP-2. L'interaction spécifique de NRP-2 avec le VEGFR-3 est aussi fondamentale au bon développement du système lymphatique, car les mutants homozygotes de NRP-2 ont un nombre de vaisseaux et de capillaires lymphatiques significativement réduit [86].

Les intégrines forment une famille de récepteurs de la matrice extracellulaire qui peuvent de façon directe ou indirecte réguler la fonction des cellules endothéliales en modulant la signalisation intracellulaire et intercellulaire [87]. Les intégrines contenant la sous-unité  $\beta 3$  se lient spécifiquement au VEGFR-2 et augmentent ainsi la signalisation du récepteur [88].

Pendant la réparation des tissus, les intégrines  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 2$  s'associent au VEGFR-2 ce qui module la lymphangiogenèse [89].

La cadherine endothéliale vasculaire (VE-cadherine) est une molécule d'adhésion spécifique pour les cellules endothéliales responsable de la formation des jonctions adhérentes [90]. Cette régulation de l'adhésion par la VE-cadherine est cruciale pour l'assemblage efficace des structures vasculaires pendant l'angiogenèse et la maintenance de l'intégrité du réseau vasculaire. La VE-cadherine interagit avec le VEGFR-2 et cette interaction est régulée par la  $\beta$ -caténine. Ceci a été démontré dans des études où le domaine de liaison entre VE-cadherine et  $\beta$ -caténine a été modifié. En éliminant ce domaine, la VE-cadherine perd sa capacité de lier le VEGFR-2, ce qui mène à une apoptose endothéliale [91]. La VE-cadherine régule la signalisation du VEGFR-2 de différentes manières. Premièrement, elle retient le récepteur à la surface de la membrane cellulaire, ce qui prévient son internalisation vers les compartiments de signalisation. Ensuite, elle atténue la phosphorylation des tyrosines chez le VEGFR-2 en associant des phosphatases, ce qui résulte aussi en une diminution de la signalisation [92]. D'un autre côté, la modulation de la VE-cadherine par le VEGFR-2 est essentielle pour la perméabilité vasculaire, l'activation du VEGFR-2 par le VEGF mène à une endocytose de la VE-cadherine à l'aide de la  $\beta$ -arrestine 2 [93].

### **1.3.5 Rôle et régulation de eNOS.**

Le principal rôle d'eNOS est celui de produire du monoxyde d'azote (NO), à partir de l'arginine en présence d'oxygène et de NADPH [94]. Le NO produit par eNOS dans les cellules endothéliales a plusieurs fonctions. Premièrement, il est essentiel dans l'induction

de la perméabilité des cellules endothéliales, une étape qui est très importante dans le processus de l'angiogenèse [95]. Deuxièmement, le NO est aussi nécessaire pour la régulation du flux sanguin. Il agit principalement, en diffusant directement vers les cellules musculaires lisses, qui forment les parois des artérioles, en induisant leur relaxation par l'activation de la guanylyl cyclase et la production de guanosine Mono Phosphate cyclique (cGMP)[96]. Dans les reins, l'action du NO induit une augmentation du flux sanguin dans les glomérules, ce qui augmente la filtration et la formation de l'urine [97]. Troisièmement, le NO est capable également de réduire l'inflammation dans les cellules endothéliales, en bloquant l'exocytose des différents médiateurs de l'inflammation dans ces cellules [98].

Comme toutes les autres enzymes, l'activité enzymatique d'eNOS est aussi régulée par différents processus, dont la phosphorylation. La phosphorylation des résidus sérine 1177 et 635 sert comme signal stimulant pour l'activité de l'enzyme [99]. D'un autre côté, la phosphorylation des résidus sérine 116 et thréonine 495, a un rôle inhibiteur de l'activité de eNOS en bloquant la liaison de la calmoduline [100]. L'association de la calmoduline à eNOS est essentielle pour l'activité enzymatique de cette dernière, car elle facilite le flux d'électrons dans le domaine réductase d'eNOS et donc la production de NO [94]. À son tour, la calmoduline atteint seulement son plus haut niveau d'association à eNOS quand les niveaux de calcium intracellulaire sont suffisants, et ce processus est assuré grâce à l'activation de la phospholipase-c-gamma (PLC  $\gamma$ ) par le VEGFR-2 [101]. Des études ont révélé qu'Akt régule la phosphorylation d'eNOS au niveau du résidu sérine 1177 de l'enzyme [102]. La signalisation par le VEGFR-2 peut également stimuler eNOS en activant la phosphatase calcineurine. L'activation de cette enzyme mène à la

déphosphorylation du résidu sérine 116 chez eNOS, et donc à l'enlèvement de cette phosphorylation inhibitrice [102].

## 1.4 Régulation des récepteurs tyrosine kinases (RTKs)

L'activation des récepteurs tyrosine kinases ou RTKs à la surface de la membrane cellulaire génère la transduction d'une cascade de signalisation ainsi que des mécanismes pour réguler cette signalisation. Ces mécanismes incluent la déphosphorylation des récepteurs et l'internalisation des récepteurs par endocytose, ce qui mène généralement à leur dégradation dans les lysosomes [103].

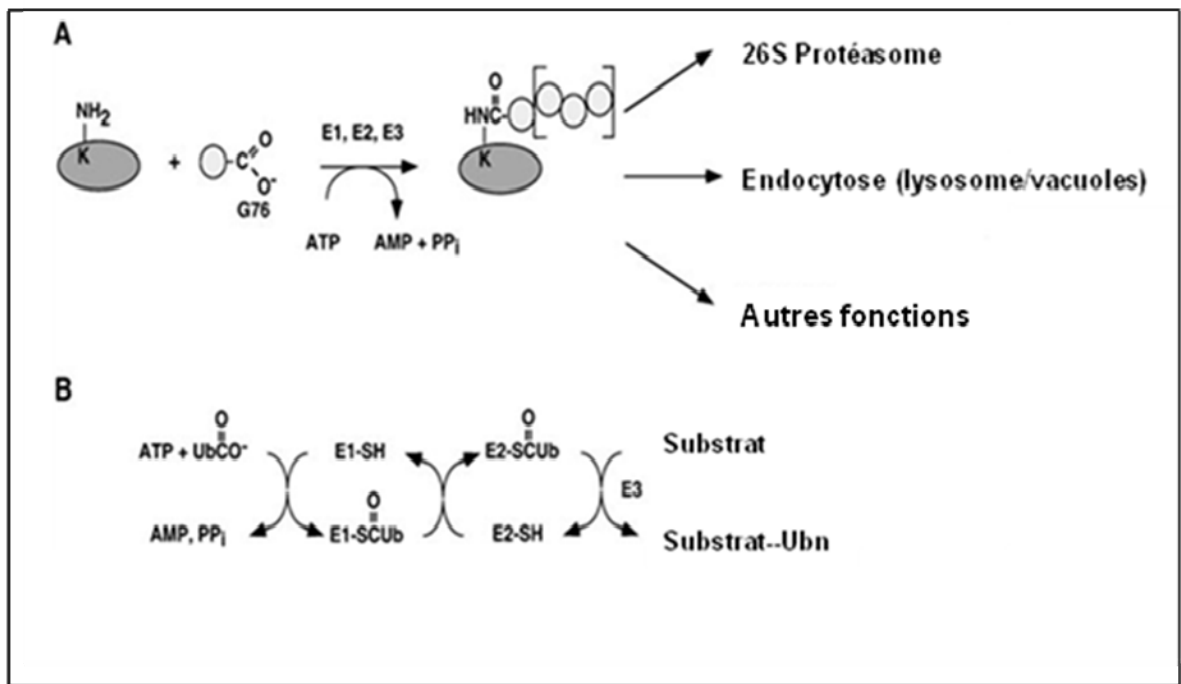
L'endocytose a été établie comme étant la principale voie pour la régulation à la baisse des récepteurs tyrosine kinases. Suite à une stimulation induite par un ligand, les récepteurs internalisés peuvent être soit réacheminés à la membrane cellulaire ou dégradés via la voie des lysosomes. Plusieurs mécanismes d'internalisation ont été identifiés, mais le plus important reste celui dépendant de la clathrine qui assure un retrait rapide des récepteurs de la surface cellulaire. Cette internalisation est importante pour prévenir une activation soutenue des récepteurs à la membrane cellulaire et dans les vésicules, ce qui pourrait mener à une transformation cellulaire ou la tumorigenèse [104]. Les premiers récepteurs chez les mammifères pour lesquels l'internalisation a été étudiée sont le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR) et le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (EGFR) [105] [106].

Il a été prouvé que l'ubiquitine joue un rôle très important dans le processus d'internalisation et de dégradation des RTKs, via les lysosomes et le protéasome. L'ubiquitination des RTKs peut avoir différentes fonctions, dépendamment du type de la chaîne d'ubiquitine attachée au récepteur. Les chaînes d'ubiquitine sont formées par l'addition séquentielle d'une entité d'ubiquitine à un résidu lysine de la protéine ciblée.



Cette réaction requiert l'action séquentielle de différentes enzymes : 1) une enzyme activatrice (E1) qui forme un 'thiol ester' avec le groupe carboxylique de la glycine 76 de l'ubiquitine, 2) une enzyme de conjugaison (conjugating) (E2) qui porte transitoirement la molécule d'ubiquitine activée en 'thiol ester', et 3) une ligase (E3) qui transfère l'ubiquitine activée de la E2 vers une lysine du substrat ou d'une autre molécule d'ubiquitine [107] (Figure 1.3). Ce mécanisme, formé par ces trois étapes, initie toutes les réactions d'ubiquitination connues, indépendamment si le substrat subira la protéolyse dans le protéasome, l'endocytose, ou une autre sort.

Les chaînes d'ubiquitine formées sur la lysine 63 (K63) ont une conformation linéaire qui ne possède pas de fonctions protéolytiques mais qui fonctionnent comme des échafauds [108], au même titre que les protéines mono-ubiquitinées. Les chaînes d'ubiquitine liées à la lysine 48 (K48) ont une topologie différente et une conformation fermée, ce qui permet de cibler les protéines pour la dégradation dans le protéasome. La mono-ubiquitination et les chaînes d'ubiquitine liées aux lysines 63 agissent comme des sites de liaison pour d'autres protéines qui contiennent des domaines ou des motifs d'interaction avec l'ubiquitine (UIM ou UID) [109]. Environ 16 UIMs ont été découverts jusqu'à maintenant et il est évident que chaque domaine a une affinité spécifique pour un type de chaîne d'ubiquitine. Cette association permet un important niveau de régulation des voies de signalisation via l'ubiquitine qui peut être comparé à celui de la phosphorylation [109]. Ces motifs ne montrent pas des séquences strictement conservées et leur interaction avec l'ubiquitine dirige le flux d'information dans des voies de signalisation très spécifiques. La dégradation n'est pas le seul sort des protéines étiquetées avec l'ubiquitine, car



**Figure 1.3.** **A)** Vue générale du mécanisme de l'ubiquitination d'une protéine. **B)** Voie enzymatique de la conjugaison de l'ubiquitine. (Adapté de Pickart, M. Annual Review of Biochemistry, 2001).

l'ubiquitination régule aussi certains processus tels que la fonction ribosomale, la réparation post-répliationnelle de l'ADN, l'initiation de la réponse inflammatoire et la fonction de certains facteurs de transcription [110] [111, 112] [113]. Initialement, des études réalisées chez la levure ont démontré que l'ubiquitination était nécessaire pour l'internalisation des protéines transmembranaires [114], mais par la suite, des études utilisant le transporteur perméase de l'uracile ont établi que même si la mono-ubiquitination est suffisante pour induire l'endocytose du récepteur, les chaînes de poly-ubiquitine ajoutées sur des lysines 63 sont nécessaires pour une endocytose efficace et pour le recyclage du récepteur [115]. D'autres études plus récentes effectuées dans des cellules de mammifères ont démontré que l'ubiquitination des récepteurs n'est pas essentielle pour leur internalisation, mais qu'elle est nécessaire pour réguler ce processus [116]. La mono-ubiquitination et les chaînes d'ubiquitine liées aux lysines 63 agissent comme signaux de triage qui sont reconnus par des protéines du complexe de triage endosomal requis pour le transport (ESCRT), lequel contient des motifs qui interagissent avec l'ubiquitine ou UIMs. Les ESCRTs recrutent et organisent les récepteurs pour leur internalisation vers la lumière endosomale, ce qui génère des corps multi-vésiculaires (MVBs) [117].

Une fois les récepteurs internalisés dans les MVBs, la fusion de ces derniers avec les lysosomes résulte en une dégradation des récepteurs grâce à des protéases dépendantes de la lumière acide des lysosomes [118]. Des mutations ponctuelles peuvent apparaître dans le domaine cytosolique des RTKs. Ces mutations atténuent la modulation à la baisse des RTKs, ce qui résulte en une dégradation retardée des récepteurs [104]. La perturbation de l'ubiquitination des RTKs ou du complexe ESCRT potentialise la stabilité des récepteurs,

ce qui prolonge la signalisation des récepteurs et induit la transformation cellulaire. L'internalisation des récepteur tyrosine kinase, comme par exemple le VEGFR-2, n'implique nécessairement la dégradation du récepteur. La dé-ubiquitination des protéines a aussi un impact critique sur le trafic intracellulaire. Certaines déubiquitinasés (DUB) ont comme rôle la régulation de la dégradation de plusieurs récepteurs tyrosine kinases, comme par exemple l'EGFR. La déubiquitinasé AMSH, prévient le trafic du EGFR vers les MVBs et promeuve le recyclage du récepteur vers la membrane cellulaire [119]. D'autres déubiquitinasés, régulent le trafic au niveau de la membrane cellulaire. Tel est le cas pour la déubiquitinasé Ubp1 chez la levure, laquelle bloque l'internalisation du transporteur Ste6 sans affecter son état d'ubiquitination [120]. Plus d'études sont nécessaires pour mieux comprendre la façon donc ce déubiquitinasés agissent et régulent le trafic des récepteurs et autres voie de signalisation cellulaire.

#### **1.4.1 Régulation du trafic intracellulaire et de la signalisation du VEGFR-2.**

Des études effectuées récemment, mettent en évidence la présence de signalisation des certains RTKs dans des compartiments intracellulaire, et non seulement au niveau de la membrane cellulaire [121]. Il a été démontré, que même quand le VEGFR-2 se trouve dans des endosomes contenant l'enzyme PLC  $\gamma$  phosphorylée, il est encore capable d'activer la voie de signalisation de la kinase MAPK [122]. Des protéines chaperons jouent aussi un rôle important dans le maintien de la signalisation intracellulaire du VEGFR-2. La protéine chaperon HSP-90 (Heat Shock Protein 90) lie le C-terminal du VEGFR-2 et régule la transduction du signal pour la migration cellulaire, en phosphorylant la kinase pour

l'adhésion focale, FAK (Focal Adhesion Kinase) [123]. D'autres études ont démontré aussi le rôle de l'internalisation du VEGFR-2 dans sa signalisation [92]. Ces études effectuées sur la VE-cadherine, montrent que sa liaison avec le VEGFR-2, maintient ce dernier au niveau de la membrane cellulaire et bloque son internalisation. En même temps la VE-cadherine lie la phosphatase DEP-1 qui réduit la phosphorylation du récepteur et régule à la baisse la signalisation via MAPK [122].

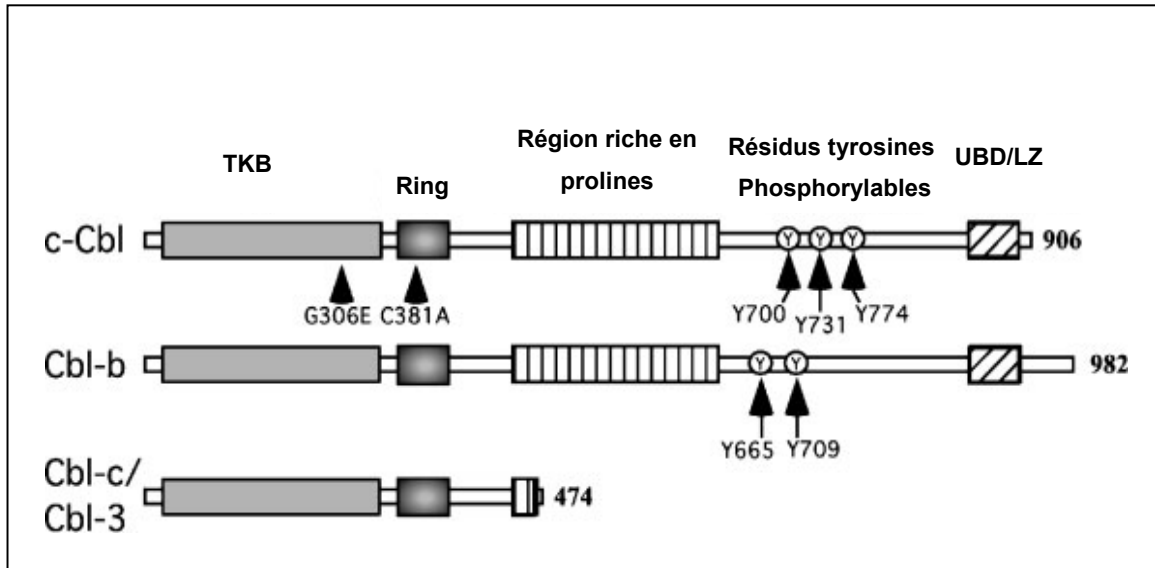
Comme la plupart des RTKs, le VEGFR-2 est internalisé grâce à un mécanisme dépendant de la clathrine. Tel que décrit précédemment, l'association de VEGFR-2 dans les endosomes avec le complexe ESCRT le dirige vers les voies de dégradation des lysosomes. La famille des Rab GTPases joue un rôle essentiel dans le trafic du récepteur. Il a été démontré que la GTPase Rab5a est nécessaire pour le maintien de la signalisation du récepteur dans les endosomes et le recyclage du récepteur vers la membrane cellulaire [124]. Dans le cas contraire, la GTPase Rab7a dirige le VEGFR-2 vers les endosomes tardifs (late endosomes) et par conséquent vers sa dégradation dans les lysosomes [124]. Le domaine C-terminal du VEGFR-2 joue un rôle important dans l'internalisation et la dégradation du récepteur. L'activation du récepteur mène à la phosphorylation des PKC non-classiques et une fois activée, les PKC phosphoryle les résidus sérines 1188 et 1191. Cette phosphorylation dirige les récepteurs pour l'internalisation et la dégradation [125].

### 1.5. L'ubiquitine ligase (E3) c-Cbl

Il est maintenant clair que la reconnaissance des substrats pour l'ubiquitination dépend de la présence et de l'accessibilité des séquences primaires ou des motifs structurales chez les substrats. Ces signaux d'ubiquitination sont reconnus spécifiquement par l'ubiquitine ligase (E3) et par conséquent, les E3s sont les centres déterminants pour la spécificité dans l'ubiquitination [126]. Un premier groupe d'E3 ligases a été découvert et il contient le domaine appelé HECT. Ce domaine, formé par 350 acides aminés, contient un résidu cystéine conservé strictement qui forme un lien 'thiol ester' pendant le processus du transfert de l'ubiquitine vers la protéine cible [127]. Plus récemment, un autre groupe de E3 ligases a été introduit lequel partage un élément structuralement différent à celui du groupe HECT. Le 'RING finger', formé par 70 résidus, contient un ensemble de cystéines et de histidines qui ont comme rôle la régulation d'une conformation globulaire nécessaire dans l'activité catalytique de ce groupe de E3s [128]. Les modules catalytiques de ces deux groupes, n'ont aucune relation au niveau de leurs séquences ni de leurs structures et ce sont ces différences qui déterminent leurs spécificités de liaison avec les E2.

La famille des ubiquitines ligases Cbl a récemment émergée comme étant un régulateur clé des RTKs, en promouvant l'ubiquitination des récepteurs activés et en les ciblant pour une dégradation dans les lysosomes ou dans le protéasome. Chez les mammifères, la famille des Cbls est composée de c-Cbl, Cbl-b, et Cbl-3 [129]. Les trois membres ont une forte homologie dans leur séquence terminale d'acides aminés, laquelle est formée d'un domaine liant les tyrosines kinases, TKB. Le TKB contient un domaine SH2 variable qui sert dans la liaison avec des résidus tyrosines phosphorylés spécifiques chez les RTKs. Un domaine

anneau (RING) suit le domaine TKB, qui régule l'association de la E2, et le transfert de l'ubiquitine vers le RTK [130]. La portion C terminal des Cbls contient une région riche en prolines, très rudimentaire chez Cbl-3, qui régule des interactions avec d'autres protéines contenant un domaine SH3. Cette région est suivie par plusieurs résidus tyrosines phosphorylables qui sont nécessaires non seulement pour l'activité des enzymes mais aussi pour leur capacité à agir comme des protéines adaptatrices. Les ubiquitine ligases c-Cbl et Cbl-b ont une séquence homologue pour le domaine leucine 'zipper' et le domaine d'association avec l'ubiquitine (UBD). Le domaine leucine 'zipper' permet l'homo et l'hétérodimerisation des ligases alors que le domaine UBD permet l'association aux ubiquitines (Figure 1.4). Le recrutement de Cbl aux RTKs activés mène à la phosphorylation de Cbl, ce qui est nécessaire à une activité ligase (E3) efficace de la protéine [131]. Des analyses effectuées sur une mutation générée dans le domaine TKB de Cbl ont démontré que ce domaine est indispensable à Cbl pour promouvoir la multi-ubiquitination. L'interaction du domaine TKB de Cbl avec les RTKs sert aussi à assurer la bonne orientation de son association avec le récepteur et permettre le transfert de l'ubiquitine. Des gènes similaires à ceux des Cbls ont été retrouvés chez d'autres organismes tels que le *C. elegans* (SLI-1), la drosophile (d-Cbl), le *Xenopus*, et les poulets (g-Cbl) [132]. Une comparaison des séquences primaires de Cbl chez différentes espèces, révèle une forte conservation évolutive du domaine TKB et même du domaine RING de Cbl [133]. Chez la drosophile, d-Cbl est exprimée d'une manière très comparable structuralement à celle chez l'humain. Le grand degré de conservation des domaines TKB



**Figure 1.4.** La famille des ubiquitine ligases Cbl chez les mammifères. (Adapté de Swaminathan G et al, Journal of Cellular Physiology, 2006)



et RING souligne l'importance de ces domaines dans le fonctionnement de Cbl, et suggère que ces motifs jouent un rôle unique qui est particulière à la famille des Cbls [134].

Les niveaux d'expression des ARN messagers des Cbls chez les mammifères varient de manière différentielle. Par exemple, c-Cbl et Cbl-b sont exprimés dans la plupart des tissus, mais les niveaux les plus hauts sont retrouvés dans le thymus et les testicules [135]. Pour ce qui est de Cbl-c, il est faiblement exprimé dans les tissus hématopoïétiques mais il est fort exprimé dans les tissus épithéliaux [136]. Les Cbls se localisent principalement dans le cytosol, mais elles peuvent aussi se retrouver à la membrane cellulaire ou associées au cytosquelette [137] [138]. La phosphorylation de Cbl est associée avec sa translocation vers la membrane cellulaire et avec la régulation négative des différents récepteurs tyrosine kinases, non-récepteurs protéines tyrosine kinases, phosphatases, protéines adaptatrices, et des protéines du cytosquelette. L'ubiquitination des RTKs par les Cbls, plus spécifiquement c-Cbl dans les mammifères, a comme but de réguler à la baisse ces récepteurs via son association avec une phosphotyrosine spécifique du récepteur ciblé.

D'une manière directe ou via une protéine adaptatrice, c-Cbl induit l'ubiquitination et la dégradation des récepteurs du facteur dérivé de plaquettes (PDGF), le facteur stimulant de colonies (CSF-1), le facteur de croissance des hépatocytes (HGF), le VEGF, le facteur de croissance de fibroblastes (FGF) et le récepteur à l'insuline (IR). La régulation à la baisse des RTKs par c-Cbl nécessite aussi d'être modulée. La protéine Sprouty2 (Spry2) se lie au domaine anneau (RING) de c-Cbl et bloque son domaine SH2, ce qui prévient l'association des enzymes E2 et ainsi une diminution de l'activité ligase de c-Cbl [139]. c-Cbl peut

également être séquestré par la forme activée de cdc42, ce qui bloque la liaison de c-Cbl aux RTKs et par conséquent l'ubiquitination et la dégradation sont diminuées.

D'une manière plus spécifique, il a été démontrée que c-Cbl est nécessaire pour le contrôle des processus d'ubiquitination et de dégradation du VEGFR-2 [140]. Dans cette étude la surexpression de c-Cbl induit l'ubiquitination de VEGFR-2, et donc sa dégradation. D'autres études démontrent que c-Cbl est nécessaire pour atténuer la signalisation du VEGFR-2 en réponse à un stimulus angiogénique. Cette régulation implique une association de c-Cbl au résidu tyrosine 1059 du C-terminal du VEGFR-2, l'ubiquitination de PLC  $\gamma$ , et par conséquent la diminution de l'angiogenèse [141].

## 1.6 Hypothèse du projet et objectif.

Tel qu'exposé dans le chapitre d'introduction, l'angiogenèse joue un rôle essentiel dès le développement de l'embryon jusqu'à l'âge adulte où elle contribue à maintenir l'homéostasie du flux sanguin vers les tissus et surtout la disponibilité de l'oxygène. Il est évident maintenant que dans les cellules endothéliales, l'angiogenèse est contrôlée principalement par l'activation et la signalisation du VEGFR-2. Cette signalisation est fortement contrôlée par différents facteurs intra- et extra-cellulaires, un des plus importants étant l'ubiquitination du récepteur pour l'amener à la dégradation. Ce processus est orchestré principalement par l'ubiquitine ligase c-Cbl, qui une fois liée à l'une des tyrosines phosphorylées du domaine cytoplasmique du récepteur, régule l'addition des chaînes d'ubiquitine sur des résidus lysines du récepteur. Des travaux antérieurs dans notre laboratoire ont démontré que la surexpression de c-Cbl dans des cellules COS-7, mène à l'induction de l'ubiquitination du VEGFR-2 et à sa dégradation [140].

Dans cette étude nous nous sommes basés sur ce résultat et sur l'hypothèse voulant, qu'une inhibition de l'association de c-Cbl au VEGFR-2 et donc de son ubiquitination, mène à une diminution de la dégradation du récepteur et à l'augmentation de sa signalisation. Ces deux phénomènes peuvent se traduire, en une perte de la régulation des signaux angiogéniques et donc, une angiogenèse plus prononcée. L'utilisation de récepteurs tronqués au niveau intracellulaire et d'autres mutants de résidus tyrosines, nous permettra d'évaluer l'importance de chacun de ces résidus dans la modulation de l'activité du VEGFR-2. Notre objectif est d'analyser si un ou plusieurs des résidus tyrosines du domaine C-terminal du récepteur, sont non seulement nécessaires pour l'association de c-Cbl au VEGFR-2, mais

aussi fondamentaux pour son ubiquitination. Une meilleure compréhension des processus qui régulent l'activité du VEGFR-2 et l'action du VEGF dans les cellules endothéliales, nous permettra de moduler son activité dans certaines pathologies où l'angiogenèse joue un rôle central.

## **2 Matériel et Méthodes**

**2.1 Construction des plasmides, mutagenèses, et clonage :** Les plasmides pour le VEGFR-2 WT (pRK7), K868R (pRK7), c-Cbl (pXM139), et HA-Ubiquitine (pCMV) qui ont été utilisés ont été décrits précédemment [140]. Les mutants inactifs du domaine kinase, D1028A et D1046A, ont été créés par des mutations ponctuelles dans le domaine kinase du récepteur VEGFR-2 (pRK7) en utilisant la trousse de mutagenèse 'Quickchange' (Stratagene). Les amorces utilisées furent les suivants: 5'-GTATCCACAGGGCCCTGGCGGCACG-3' (D1028A) et 5'-CGTGGTTAAAATCTGTGCCTTTGGCTTGGCCCG-3' (D1046A). Le même protocole a été employé pour la mutagenèse des sites des tyrosines, Y1305, Y1309, Y1319, pour des phénylalanines. Les amorces 5'-AACCAGACAAGCGGCTTCCAGTCCGGATATC-3' (Y1305F), 5'-GGCTACCAGTCCGGATTTCCTCCGATGACA-3' (Y1309F), et 5'-CAGACACCACCGTGTTCTCCAGTGAGGAAGC-3' (Y1319F) ont été utilisées. Pour produire le double mutant YFF (tyrosines 1309 et 1319), l'amorce du Y1309F a été utilisée sur le mutant Y1319F. Pour le mutant FYF, l'amorce pour produire le Y1305F a été utilisée sur le plasmide du Y1319F. Pour le mutant FFY l'amorce 5'-AACCAGACAAGCGGCTTCCAGTCCGGATTTC-3' a été utilisée sur le plasmide du Y1305F. Toutes les mutations ont été vérifiées par séquençage de l'ADN.

L'ADN complémentaire du VEGFR-2 WT, ainsi que les ADNs des récepteurs tronqués dans le domaine C-terminal VEGFR-2 1-1200 et VEGFR-2 1-1300, ont été insérés dans le vecteur d'expression mammifère pCMV-Tag 1 (Invitrogen) (don du Dr. Jean-François Côté, IRCM). Les ADNs ont été insérés dans le site de clonage multiple du

vecteur et les protéines ont été étiquetées Myc dans leurs domaines C-terminal. Les séquences choisies pour les sites de restriction sont 5' NotI et XhoI '3. Les amorces utilisées pour générer les sites de restriction pour les VEGFR-2 1-1200 et 1-1300 sont: 5'-TGAAGCAGCGGCCCGCCACCATGGAGCAAGGTGCTG-'3 Fwd et 5'-ACCCATCTCGAGAACAGGAGGAGAGCTC-'3, Rev (VEGFR-2WT), 5'-ACCCATCTCGAGGGAAACAGGTGAGGTAGGC-'3. Rev (VEGFR-2 1-1200), et 5'-ACCCATCTCGAGGTTTGAGCCTTCAGATGCC-'3 Rev (VEGFR-2 1-1300).

## 2.2 Transfections, Immunoprécipitations, et Immunobuvardages:

**2.2.1 Culture Cellulaire:** Les cellules COS-7 ont été cultivées dans du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Invitrogen), 2.0mM l-glutamine, 100 unités/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (HyClone), 2.0 l-glutamine, 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg /ml de streptomycine. Les cellules BAEC ont été utilisées au passage 7.

**2.2.2 Essais d'ubiquitination:** Des cellules COS-7 ont été cultivées dans des pétris de 60 ou 100 mm (récepteurs étiquetés Myc). À 80-90% de confluence, les cellules ont été transfectées avec les différents plasmides soit le VEGFR-2, c-Cbl et HA-Ubiquitine en utilisant de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Après 48 heures, les cellules ont été lysées dans du tampon contenant 1% Nonidet P-40, 50mM Tris-Base, 0.1mM EDTA, 0.1mM EGTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholate, 125mM NaCl, 10mM NEM, 20mM fluorure de sodium, 1mM pyrophosphate de sodium, 1mM orthovanadate de sodium, et

un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics). Après 30 minutes de lyse, les concentrations de protéines ont été mesurées avec un essai pour protéines DC (Bio-Rad). Des quantités égales de protéines ont été incubées avec 2µg d'anticorps anti-VEGFR-2 pour 2h à 4<sup>0</sup>C en rotation continue. Après les 2h, 50µl d'un mélange à 50% de Protéine A-Sepharose (Sigma) a été ajouté pour 1h à 4<sup>0</sup>C. Pour l'essai d'ubiquitination avec les récepteurs étiquetés Myc, l'anticorps primaire a été ajouté pendant 16h et la protéine A-Sepharose pendant 2h à 4<sup>0</sup>C. Les complexes ont été lavés trois fois avec du tampon de lyse, bouillis dans du tampon d'échantillonnage au SDS, séparés par SDS-PAGE, et transférés sur une membrane de nitrocellulose. Pour les immunobuvardages de type Western, les membranes ont été bloquées soit dans du tampon contenant 5% de lait ou 3% de BSA (phosphotyrosine totale), TBS-1X 0.01% Tween-100, Sodium Azide 1X. Après le blocage, les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires respectifs et détectés avec un système basé sur la chimioluminescence (ECL-GE Healthcare) ou par un système de détection d'infrarouges LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences).

**2.2.3 Essais d'association de c-Cbl au VEGFR-2:** Des cellules COS-7 ont été incubées dans des pétris de 60 mm. À une confluence de 80-90%, les cellules ont été transfectées avec les plasmides d'expression pour les différentes versions du VEGFR-2, et c-Cbl. Après 48h, les cellules ont été lysées avec le tampon NP-40 décrit précédemment et les lysats soumis à l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti VEGFR-2. Les immunoprécipitats ont été séparés par SDS-PAGE et l'association de c-Cbl a été évaluée par immunobuvardage avec les anticorps anti VEGFR-2 et c-Cbl.



**2.2.4 Essais de cinétique de dégradation:** Des cellules BAEC (passage 7) ont été cultivées jusqu'à obtenir 80-90 % de confluence dans des plaques de 6 puits. Ensuite, elles ont été transfectées avec des quantités égales de plasmide témoin (pCDNA3), VEGFR-2 WT, et le mutant Y1319F. Pour la stimulation au VEGF, les cellules ont été sevrées pendant 16h dans 3ml de Dulbecco's modified Eagle's medium sans sérum supplémenté avec 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Trente minutes avant la stimulation, le milieu a été enlevé et 2ml de DMEM sans sérum ont été ajoutés aux cellules. Les cellules ont été stimulées avec 40 ng/ml par puits, pour le temps correspondant. Après la stimulation, les puits ont été rincés deux fois avec du PBS 1X et les cellules lysées avec du tampon contenant 1% triton-100, 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.1% deoxycholate de sodium, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 20mM fluorure de sodium, 1mM pyrophosphate de sodium, 1mM orthovanadate de sodium, et un mélange d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics). L'électrophorèse, le transfert, le blocage et l'immuno-buvardage ont été effectués comme décrit précédemment.

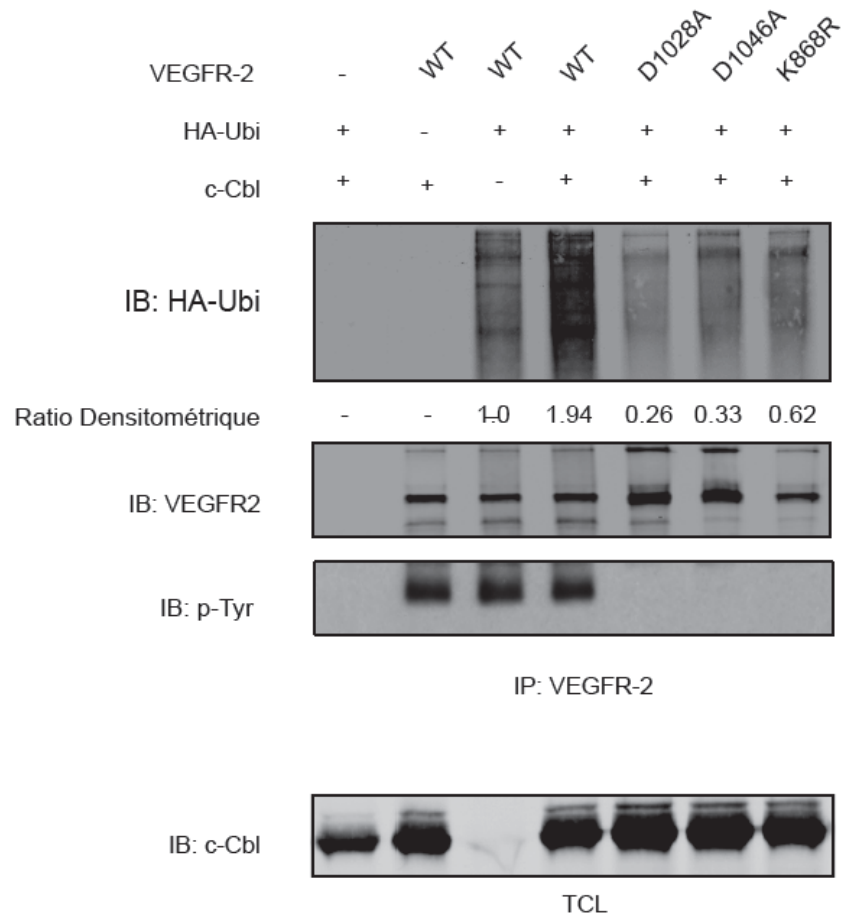
**2.3 Anticorps:** les anticorps monoclonaux anti-VEGFR-2 et polyclonaux anti-c-Cbl utilisés ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Les anticorps anti e-NOS et anti HSP-90 ont été achetés chez BD Transduction Laboratories. Les anticorps anti HA-tag, Myc-tag, et phospho- Ser<sup>1179</sup>-eNOS ont été obtenues chez Cell Signalling et l'anticorps anti phospho tyrosine (4G10) a été acheté chez Upstate Biotechnology.

### **3 Résultats**

### 3.1 *L'activité kinase du VEGFR-2 est nécessaire pour l'ubiquitination induite par c-Cbl.*

Dans le but de vérifier si l'activité kinase du VEGFR-2, et donc sa signalisation, est nécessaire pour l'ubiquitination et la dégradation, nous avons généré différents récepteurs mutants inactifs (D1028A, D1046A et K868R). En présence d'un récepteur activé, la lysine (K868) forme des liaisons avec les phosphates  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATP. Étant donné que l'ubiquitination prend place sur des résidus lysines, il était nécessaire de créer des mutants dans la pochette d'activation du récepteur sans toucher la lysine 868 qui pourrait être nécessaire pour l'ubiquitination du VEGFR-2. L'aspartate 1028 (D1028), oriente le groupe tyrosyl du résidu cible de l'autre récepteur, donc il est essentielle pour la transphosphorylation du récepteur. L'aspartate 1046 (D1046), lie le phosphate  $\alpha$  et également le magnésium, qui à son tour, coordonne les phosphate  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP [63]. Donc, ces récepteurs mutants dans le domaine kinase ne devraient pas avoir la capacité de lier l'ATP et donc de s'autophosphoryler. Il a également déjà été démontré que c-Cbl est nécessaire pour l'induction de l'ubiquitination du récepteur VEGFR-2 [140].

Des cellules COS-7 ont été transfectées avec différents récepteurs VEGFR-2 mutants (D1028A, D1046A et K868R) et le récepteur de type sauvage 'Wild Type' (WT), ainsi qu'une version étiquetée de l'ubiquitine (HA-Ubi) et c-Cbl. En exprimant ces différents mutants de VEGFR-2, la capacité de l'ubiquitine ligase c-Cbl d'induire l'ubiquitination dans les récepteurs inactivés, comparé au WT, est diminuée de façon très significative au point d'être sous le seuil de l'ubiquitination basal du WT (Figure 3.1). Ces résultats nous démontrent que l'activité kinase du VEGFR-2 est essentielle pour l'ubiquitination du récepteur par c-Cbl

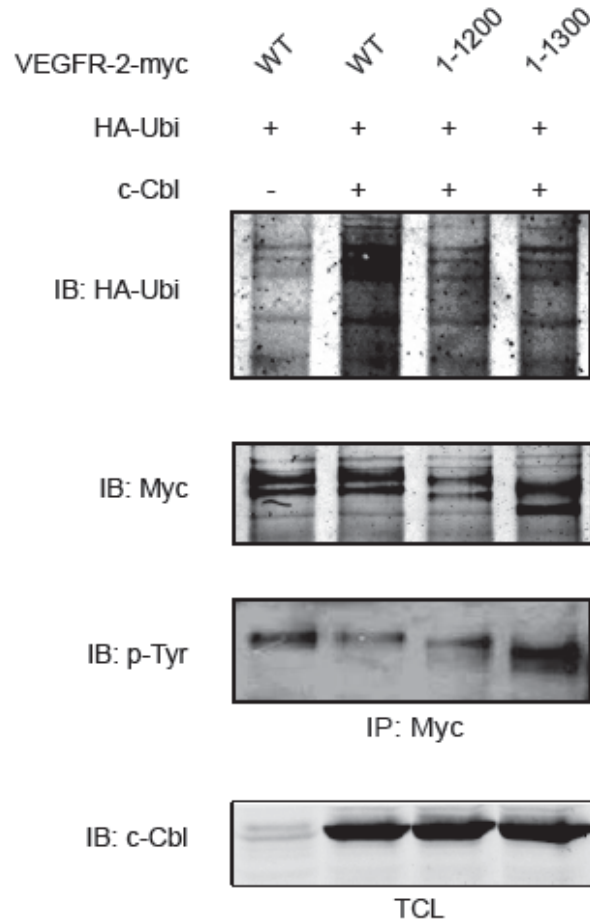


**Figure 3.1. L'activité kinase du VEGFR-2 est nécessaire pour l'ubiquitination induite par c-Cbl.** Des cellules COS-7 ont été transfectées avec les vecteurs d'expression indiqués. Les cellules ont été lysées et les lysats soumis à l'immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps anti VEGFR-2. L'ubiquitination des récepteurs a été évaluée par immunobuvardage (IB) avec l'anticorps anti HA. Les niveaux d'activation des récepteurs ont été évalués en utilisant l'anticorps anti phospho-tyrosine total (p-Tyr) de même que les niveaux de VEGFR-2. Les niveaux de c-Cbl ont été évalués en utilisant l'anticorps anti c-Cbl sur les lysats cellulaires totaux (TCL).

### *3.2 La queue C-terminal du VEGFR-2 est essentielle pour l'induction de l'ubiquitination par c-Cbl.*

Le domaine C-terminal du VEGFR-2 reconnu comme étant nécessaire pour l'internalisation du récepteur [125], donc il est essentiel d'évaluer le rôle de ce domaine dans l'ubiquitination. En utilisant des récepteurs VEGFR-2 WT et d'autres tronqués dans le domaine C-terminal (1-1200 et 1-1300) et étiquetés Myc, l'ubiquitination des récepteurs a été évaluée dans des cellules COS-7. Les récepteurs tronqués gardent la capacité de s'autophosphoryler et donc, d'être activés.

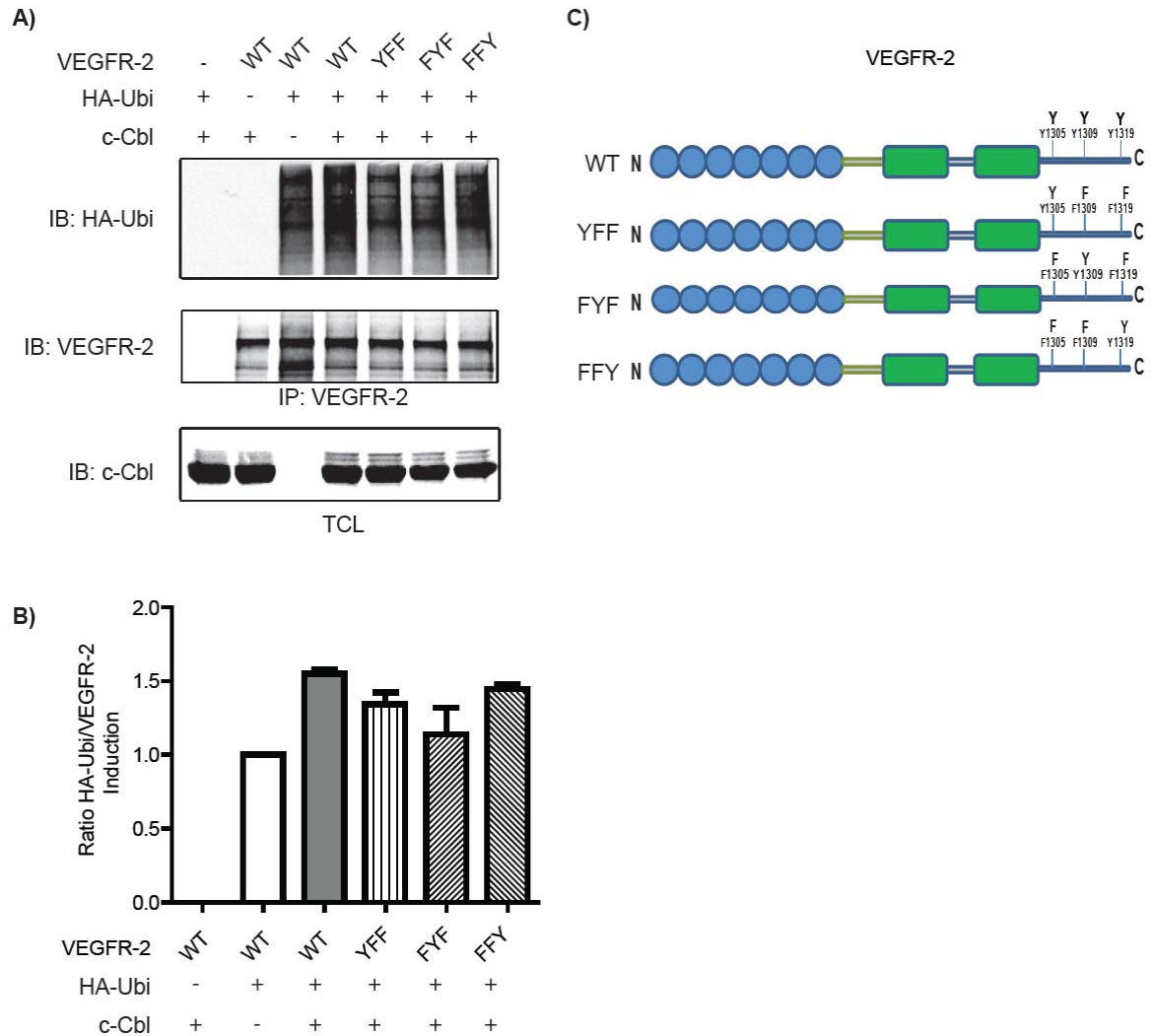
Comme observé au préalable, l'ubiquitination du récepteur WT est augmentée en surexprimant c-Cbl. Dans le cas des récepteurs tronqués au niveau du C-terminal (1-1200 et 1-1300), dont les derniers 156 et 56 acides aminés, respectivement, sont délétés, cette induction est perdue (Figure 3.2). Ces résultats nous suggèrent que dans cette région (acides aminés 1300-1356), se trouve la tyrosine, ou les tyrosines, responsable de l'association de c-Cbl avec le VEGFR-2 et par conséquent de son ubiquitination.



**Figure 3.2. La queue C-terminal du VEGFR-2 est nécessaire pour l'induction de l'ubiquitination du récepteur par c-Cbl.** Des cellules COS-7 ont été transfectées dans des plats de 100mm avec les constructions d'expression indiquées. Après 48h, les cellules ont été lysées et les lysats soumis à l'immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps anti Myc. L'ubiquitination des récepteurs a été évaluée par immunobuvardage (IB) des immunoprécipitats avec l'anticorps anti HA. Les niveaux des récepteurs dans les immunoprécipitats ont été évalués en utilisant l'anticorps anti Myc, ainsi que les niveaux de l'activation des récepteurs (IB : p-Tyr) et de c-Cbl dans les lysats totaux (TCL) avec l'anticorps anti c-Cbl.

### 3.3 *Le rôle des tyrosines 1305, 1309, et 1319 dans l'ubiquitination du VEGFR-2.*

En observant l'importance des acides aminés dans la région >1300 du VEGFR-2 pour l'ubiquitination du récepteur, il est également nécessaire de voir si ces tyrosines, les seules présentes et phosphorylables dans cette région (derniers 56 acides aminés), sont requises pour l'induction de l'ubiquitination du VEGFR-2 par c-Cbl. En créant des mutations ponctuelles doubles des tyrosines (Y) 1305, 1309, et 1319 pour des phénylalanines (F) dans cette région (Figure 3.3, C), il est possible d'étudier dans des cellules COS-7 l'induction de l'ubiquitination du VEGFR-2 (Figure 3.3, A). En mutants les tyrosines 1305 et 1319 (FYF) nous observons une diminution de 75% du niveau d'induction de l'ubiquitination du VEGFR-2. Dans le cas du mutant YFF, cette diminution est moins prononcée, mais elle est quand même de 40% comparée à celle du WT. De plus lorsque nous laissons la tyrosine 1319 intacte (FFY), l'ubiquitination du récepteur ressemble à celle du WT car la diminution de l'induction est seulement de 20% (Figure 3.3, B). Ces résultats pointent vers la tyrosine 1319 comme étant nécessaire pour l'induction maximale de l'ubiquitination du VEGFR-2.

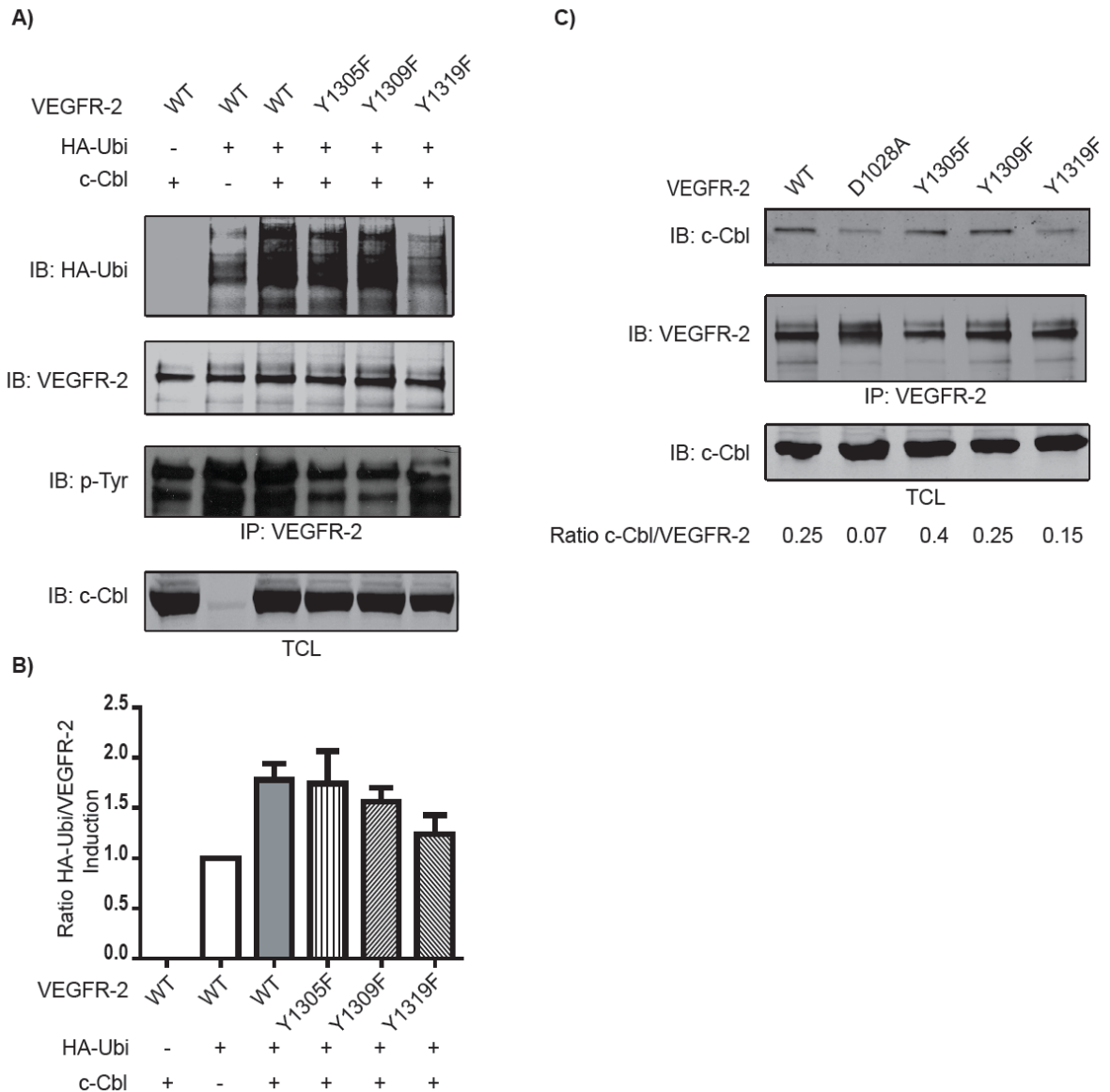


**Figure 3.3. L'effet des doubles mutations sur l'ubiquitination du VEGFR-2.** **A)** Des cellules COS-7 ont été transfectées avec les vecteurs d'expression indiqués. Les cellules ont été lysées et les lysats soumis à l'immunoprécipitation (IP) avec l'anticorps anti VEGFR-2. Les niveaux d'ubiquitination dans les immunoprécipitats ont été évalués par immunobuvardage (IB) en utilisant l'anticorps anti HA (HA-Ubi), ainsi que les niveaux de VEGFR-2. Les niveaux de c-Cbl ont été évalués dans les lysats cellulaires totaux (TCL). **B)** Représentation statistique de l'induction de l'ubiquitination par c-Cbl des différents récepteurs VEGFR-2 (n=3). **C)** Schéma des tyrosines de la queue C-terminal du VEGFR-2 WT et des différents mutants.



*3.4 La Tyrosine 1319 est nécessaire pour l'induction de l'ubiquitination du VEGFR-2 par c-Cbl et pour l'association de cette dernière au récepteur.*

Pour étudier l'effet individuel de chaque tyrosine de la queue C-terminal du VEGFR-2, les simples mutants des tyrosines Y1305F, Y1309F, et Y1319F, ainsi que le VEGFR-2 WT ont été exprimés dans des cellules COS-7 (Figure 3.4, A). Ces cellules ont aussi été transfectées avec c-Cbl et le plasmide d'expression pour l'ubiquitine (HA-Ubi). Les résultats des immunobuvardages après immunoprécipitation démontrent que l'induction de l'ubiquitination est diminuée de 75% quand la tyrosine 1319 est mutée pour une phénylalanine (Figure 3.4, B). L'induction chez le mutant Y1305F ne semble pas être affectée, alors que pour le Y1309F, il y a une légère baisse de 25% du niveau d'induction comparée à celle du récepteur WT. Il est nécessaire également, de vérifier que cette baisse d'induction de l'ubiquitination, est causée par l'inhibition de l'association de c-Cbl au récepteur. En utilisant les différents récepteurs mutants de tyrosines avec le récepteur WT et c-Cbl, nous observons une diminution de 40% de l'association de c-Cbl au VEGFR-2 dans le cas du mutant Y1319F (Figure 3.4, C). Dans le cas du mutant inactif D1028A, cette diminution est de 72% et ceci concorde avec nos résultats d'ubiquitination décrit précédemment (Figure 3.1). Pour les autres deux mutants, Y1305F et Y1309F, l'association de c-Cbl au récepteur ne semble pas être affectée.

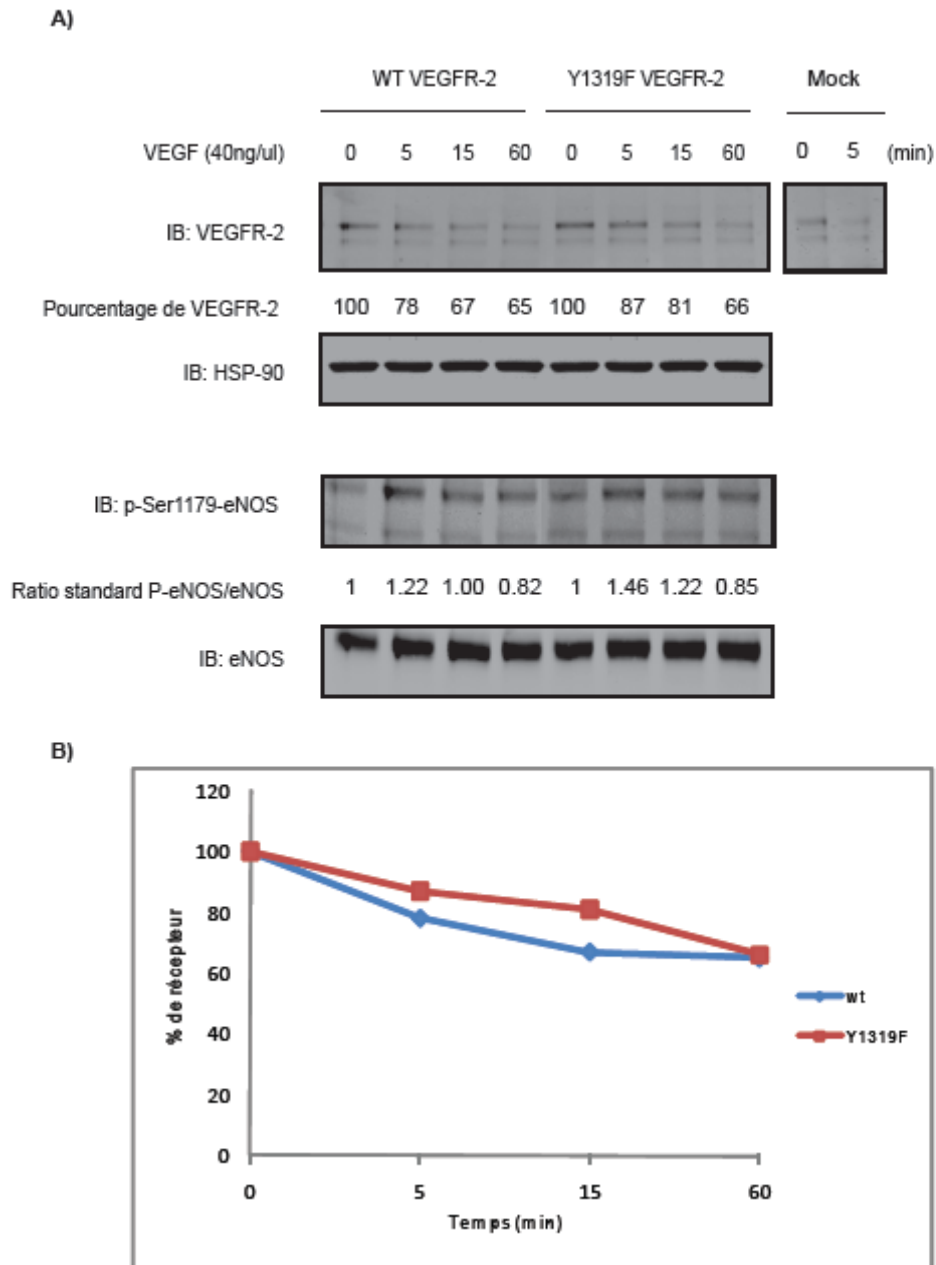


**Figure 3.4. La tyrosine 1319 est nécessaire pour l'ubiquitination du VEGFR-2 et pour l'association de cette dernière aux récepteurs.** **A)** Des cellules COS-7 ont été transfectées avec les plasmides c-Cbl, HA-ubiquitine, VEGFR-2 WT, ainsi que les trois mutants Y1305F, Y1309F, et Y1319F. Les cellules ont été lysées comme précédemment et incubées avec l'anticorps anti VEGFR-2 pour immunoprécipitation. Les complexes ont été résolus par SDS-PAGE et les immunoprécipitats buvardés avec l'anticorps anti HA pour détecter l'ubiquitination des récepteurs. **B)** Représentation statistique de l'induction de l'ubiquitination par c-Cbl des différents récepteurs (n=3). **C)** Des cellules COS-7 ont été transfectées avec les plasmides d'expression pour les différents récepteurs VEGFR-2 et c-Cbl. Les cellules sont été lysées comme précédemment et les lysats soumis à l'immunoprécipitation avec l'anticorps anti VEGFR-2. L'association de c-Cbl aux récepteurs a été évaluée par immunobuvardage sur les immunoprécipitats en utilisant l'anticorps anti c-Cbl.

### *3.5 La surexpression du mutant Y1319F dans les cellules BAEC ralentit la dégradation du VEGFR-2 et prolonge sa signalisation.*

La liaison du VEGF au VEGFR-2 induit la phosphorylation et la signalisation du récepteur. Suite à cette activation, les récepteurs sont dégradés pour atténuer la signalisation. Afin d'observer l'effet physiologique du mutant Y1319F, cette version du VEGFR-2 et le WT ont été surexprimés dans des BAEC. Les cellules ont été stimulées avec 40 ng/ml de VEGF pour les temps indiqués avant d'évaluer les niveaux de dégradation du VEGFR-2. La cinétique de dégradation du VEGFR-2 démontre qu'en surexprimant le mutant Y1319F du récepteur, la dégradation est ralentie par rapport à la surexpression du WT (Figure 3.5). Dans les cellules où le récepteur WT est surexprimé, après 5 minutes de stimulation, nous observons une baisse de 22% du récepteur comparé à seulement 13% dans les cellules où le mutant Y1319F est surexprimé. Après 15 minutes de stimulation, les niveaux de VEGFR-2 baissent de 33% pour le WT comparé à 19% pour le Y1319F. Après 60 minutes de stimulation les niveaux du VEGFR-2 sont similaires dans les deux cas, soit 65% pour le WT et 66% pour le Y1319F.

De plus, le mutant Y1319F induit une activation prolongée d'eNOS dans ces cellules. Après 5 minutes de stimulation au VEGF, l'induction de la phosphorylation de eNOS sur le résidu sérine 1179 est légèrement supérieure comparativement à celle observée dans les cellules où le récepteur WT est surexprimé. Une phosphorylation plus forte est également observée aux 15 minutes de stimulation dans le cas du récepteur mutant. Ces résultats nous suggèrent que l'activation du récepteur mutant Y1319F pourrait induire, comparativement au récepteur WT, une plus forte production de NO chez les cellules endothéliales.



**Figure 3.5. La surexpression du mutant Y1319F ralentit la dégradation du VEGFR-2 et prolonge sa signalisation. A)** Des cellules BAEC ont été transfectées avec du plasmide d'expression pour le VEGFR-2 WT, ainsi que pour le mutant Y1319F. Les cellules ont été sevrées pendant 16h et ont en suite été stimulées avec du VEGF-A (40ng/μl) pour les temps indiqués. Les cellules ont été lysées et les lysats séparés par SDS-PAGE. Les lysats ont été immunobuvardés avec les anticorps anti VEGFR-2, HSP-90, phospho-ser1179-eNOS et eNOS total. **B)** Graphique % de récepteur vs temps de stimulation au VEGF (min).

## 4 Discussion

Étant donné l'importance de l'angiogenèse comme processus biologique pour maintenir l'homéostasie du flux sanguin dans le corps, les mécanismes qui la contrôlent sont l'objet d'études afin de mieux comprendre sa régulation. Plusieurs facteurs jouent un rôle dans la régulation de l'angiogenèse, mais deux des plus importants sont le VEGF et le récepteur VEGFR-2. La signalisation via le VEGFR-2 mène à la prolifération, la migration, et la survie des cellules endothéliales. Cette réponse est contrôlée par plusieurs mécanismes tels que certaines phosphatases spécifiques ou l'ubiquitination et la dégradation du récepteur. L'internalisation et la dégradation des récepteurs tyrosine kinases sont essentielles pour atténuer la réponse angiogénique induite par le VEGF. Dans notre étude, l'importance du domaine C-terminal du VEGFR-2 pour son ubiquitination, principalement par la protéine ligase c-Cbl, a été évalué.

Pour démontrer l'importance de l'activité et de la signalisation du VEGFR-2 pour son ubiquitination, nous avons comparé l'ubiquitination du récepteur WT avec celle des récepteurs kinase inactifs. Ces récepteurs inactifs ont été mutés dans leur pochette d'activation, site de liaison de l'ATP, et donc leur capacité d'être auto-phosphorylés et d'induire une cascade de signalisation ont été perdues. Dans des cellules COS-7, l'expression des différents récepteurs VEGFR-2 démontrent que l'activité kinase du VEGFR-2 est nécessaire pour le recrutement et l'activation de c-Cbl ce qui amène à une induction de l'ubiquitination du récepteur. Nos résultats vont dans le même sens que ceux qui ont démontré qu'une inhibition de l'activation du VEGFR-2, par l'inhibiteur tyrosine

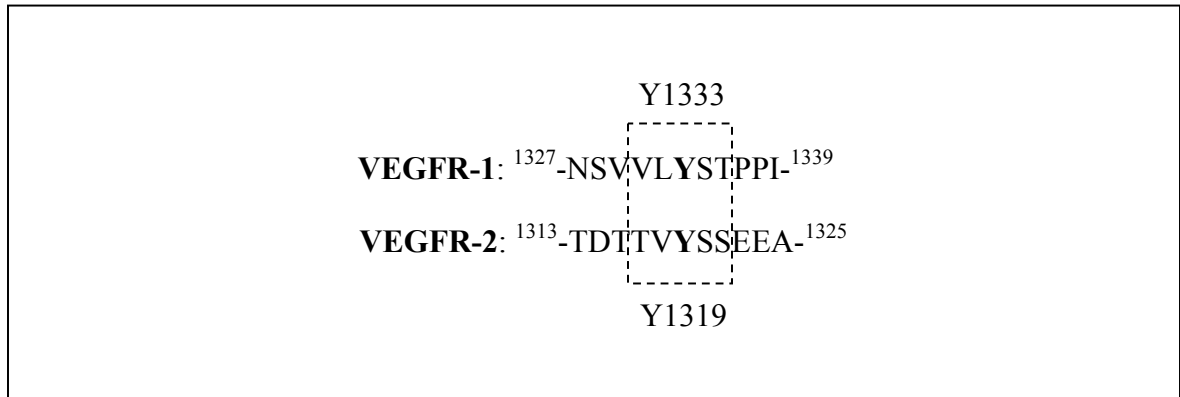
kinase SU5416 bloque l'ubiquitination, le trafic intracellulaire des récepteurs, et donc leur dégradation [142].

L'induction de l'ubiquitination du VEGFR-2 par c-Cbl requiert, suite à l'activation du VEGFR-2, la liaison de c-Cbl avec le domaine C-terminal du récepteur et la phosphorylation de c-Cbl. Comme discuté précédemment, l'association de c-Cbl avec les RTKs s'effectue au niveau d'un résidu de tyrosine phosphorylé. Il est donc nécessaire, dans le cas du VEGFR-2, d'élucider dans quelle région du domaine C-terminal du VEGFR-2 pourrait se localiser la tyrosine impliquée dans cette association essentielle pour l'ubiquitination du récepteur. Pour plusieurs récepteurs et non-récepteurs tyrosine kinases, la tyrosine nécessaire et la séquence qui entoure cette tyrosine a été découverte. Dans le cas du VEGFR-1, cette tyrosine correspond au résidu 1333 du récepteur et se trouve dans la queue C-terminale [143].

En évaluant l'induction de l'ubiquitination par c-Cbl des récepteurs tronqués dans la queue C-terminal du VEGFR-2 (1-1200, 1-1300), nous avons observé une perte de cette induction comparativement au récepteur WT. La diminution de cette induction par le mutant VEGFR-2 1-1300, dont les derniers 56 acides aminés ont été éliminés, suggère que le site d'association de c-Cbl se trouve au niveau d'une des tyrosines de cette région. Ces récepteurs ont dû être étiquetés Myc dans leurs domaines C-terminal, car les anticorps fonctionnels anti VEGFR-2 reconnaissent cette région du récepteur et elle est absente chez les mutants.

Afin d'établir quelle tyrosine de cette région est requise pour l'ubiquitination du récepteur, des mutants simples et doubles du VEGFR-2 ont été créés par mutagenèse directe. Ces

tyrosines, qui correspondent aux trois dernières tyrosines phosphorylables du VEGFR-2, ont été mutées pour des phénylalanines. Cette mutation affecte leur capacité d'être phosphorylées sans changer leur conformation. Des essais avec les doubles mutants pour ces tyrosines (YFF, FYF, FFY), démontrent que parmi elles, la tyrosine 1319 est nécessaire pour l'association de c-Cbl au VEGFR-2 et pour son ubiquitination. La tyrosine 1305 semble avoir également un effet sur l'ubiquitination du récepteur, mais comme observé à la figure 3.4 C), cet effet n'est pas dû à la capacité de c-Cbl de lier le récepteur. Pour plusieurs RTKs, la séquence consensus entourant la tyrosine nécessaire pour l'association au récepteur a été caractérisée, mais elle reste quand même flexible [144]. Dans le cas du EGFR et le VEGFR-1, la présence de deux résidus sérines ou un résidu sérine et une thréonine respectivement, suite au résidu phospho-tyrosine, augmente l'affinité pour l'association du domaine TKB de c-Cbl aux récepteurs. En même temps, un résidu proline situé à quatre résidus de la phospho-tyrosine est aussi nécessaire pour la liaison de c-Cbl. Ce résidu proline est absent dans le récepteur Met, mais il est remplacé par un résidu glutamate [144]. Dans le cas du VEGFR-2, la séquence des acides aminés autour de la tyrosine 1319 démontre la présence des sérines 1320 et 1321, et du glutamate 1323. Cette séquence suggère qu'ils sont nécessaires pour la liaison et l'orientation de c-Cbl au VEGFR-2, car elle ressemble celle nécessaire pour le VEGFR-1 [143] (Figure 4.1). D'autres expériences pour démontrer la dissociation de c-Cbl au récepteur Y1319F, peuvent aussi être utiles. Par exemple, des constructions du domaine TKB de Cbl couplé au GST peuvent être employés pour réaliser des expériences 'pull-down' et ainsi, corroborer l'importance de la tyrosine Y1319 pour l'association de c-Cbl au VEGFR-2. Des



**Figure 4.1.** Comparaison des séquences entourant les tyrosines nécessaires pour l'association de c-Cbl et l'ubiquitination des récepteurs VEGFR-1 et 2. (Adapté de Kobayashi, S. et al. The FASEB Journal, 2004).



expériences de co-localisation peuvent aussi être utiles pour voir, si en mutant le résidu 1319, la capacité de c-Cbl de lier le récepteur est affectée. Les résultats de l'expression des mutants simples dans des cellules COS-7, nous montrent la tyrosine 1319 comme étant nécessaire pour l'induction de l'ubiquitination du VEGFR-2. Le changement de ce résidu pour la phénylalanine, mène à une diminution près de 50 % de l'induction de l'ubiquitination du récepteur. Il était nécessaire également d'évaluer l'importance de la tyrosine 1319 pour la dégradation du récepteur. Pour cela, nous avons décidé de tester, dans des cellules endothéliales aortiques bovines (BAEC), l'effet de la surexpression du mutant 1319 et celle du récepteur WT sur la dégradation du récepteur et l'activation des voies de signalisation. Dans des cellules BAEC stimulées avec du VEGF, où la version mutante du VEGFR-2 a été exprimée, la cinétique de dégradation du récepteur est ralentie par rapport à celle où le récepteur WT a été surexprimé. Ce ralentissement de la dégradation du VEGFR-2 nous confirme l'importance de la tyrosine 1319 pour l'ubiquitination du récepteur et son acheminement vers les voies de dégradation. En même temps, la signalisation du VEGFR-2 semble être prolongée dans les cellules où le récepteur mutant Y1319F a été exprimé. En observant la signalisation d'eNOS, nous pouvons constater que l'enzyme est plus fortement phosphorylée suite à une stimulation au VEGF. Cette hausse du niveau d'activité d'eNOS nous permet de déduire, qu'en l'absence du site de liaison pour c-Cbl dans le domaine C-terminal du VEGFR-2, les signaux pour la prolifération, la migration et la perméabilité vasculaire sont augmentés chez les cellules endothéliales.

Il est important aussi d'évaluer dans le futur, si la surexpression du mutant Y1319F induit une phosphorylation plus forte des kinases AKT, MAPK et Erk dans les cellules

endothéliales. Une signalisation plus puissante via ces kinases suite à l'activation du récepteur, ajouterait plus d'évidence sur l'activation soutenue des voies de prolifération, migration et survie dans ces cellules.

Les résultats ici décrit proviennent d'une seule expérience, donc il est très important de la répéter avec le but d'obtenir une meilleure surexpression des récepteurs et pouvoir observer une meilleure cinétique de dégradation. Parallèlement, nous pourrions aussi utiliser nos constructions des récepteurs étiquetés, VEGFR-2-Myc WT et Y1319F-Myc, et les exprimer dans des cellules BAEC pour comparer leur cinétique de dégradation et l'activation des voies de signalisation suite à une stimulation au VEGF.

Ces résultats restent quand même encourageants, car ils vont dans la même direction que ceux qui ont démontré qu'en exprimant c-Cbl, VEGFR-2 et eNOS dans des cellules COS-7, la production de monoxyde d'azote est réduite considérablement [140]. Ils ont ainsi démontré que l'expression d'une version mutante de c-Cbl dans le domaine RING (70Z/3-Cbl), induit une augmentation de la production de monoxyde d'azote suite à une stimulation au VEGF. Donc, une combinaison de l'inhibition de la dégradation et de l'augmentation de la signalisation du VEGFR-2 pourrait conduire non seulement à la transformation de cellules endothéliales normales vers de cellules tumorales, mais aussi contribuer à la croissance et à la survie des tumeurs. Il a été démontré que pour plusieurs RTKs, incluant l'EGFR, le récepteur pour le facteur de croissance des hépatocytes (Met/HGFR), le PDGFR, et le CSF-1, la mutation de la tyrosine, nécessaire pour l'association de c-Cbl au récepteur pour une phénylalanine, découple cette association et inhibe l'ubiquitination des récepteurs [145].

Dans plusieurs types de glioblastomes, la domaine C-terminal de EGFR est tronqué et la tyrosine, Y1045, qui régule l'association de c-Cbl au récepteur est absente [146]. L'absence de ce site diminue considérablement l'internalisation et la dégradation du récepteur. Dans d'autres cas, cette tyrosine est hypo-phosphorylée et compromet le recrutement de Cbl et l'ubiquitination du récepteur [147]. Dans plusieurs cas de cancers du poumon, la mutation de la tyrosine Y1003 pour une phénylalanine dans le récepteur Met, mène à une dégradation déficiente du récepteur et éventuellement à la transformation des cellules [148]. D'une manière très similaire, chez le récepteur CSF-1 la perte du site de liaison pour le TKB de c-Cbl, Y698, augmente l'activité transformante du CSF-1R et mène à la dérégulation oncogénique du récepteur [149].

## 5 Perspectives Futures

La découverte de la région et de la tyrosine essentielles pour l'ubiquitination du récepteur VEGFR-2, ouvre des portes d'investigation pour effectuer d'autres études *in vitro* et *in vivo*. Des études *in vitro* pourraient être effectuées pour comparer la production de NO par les cellules endothéliales transfectées avec le mutant Y1319F ou le récepteur WT. Des essais de perméabilité, en utilisant des chambres Boyden/Transwell, seraient très utiles pour voir si la surexpression du mutant Y1319F dans des cellules endothéliales mime la perméabilité excessive des vaisseaux observée dans des conditions pathologiques tels que les tumeurs. Pour évaluer la migration des cellules où le mutant Y1319F est surexprimé, des essais de fermeture de plaies peuvent être réalisés afin de déterminer l'effet de l'absence de dégradation du VEGFR-2. Un phénotype migratoire plus prononcé dans ces cellules pourrait indiquer une augmentation de la formation des vaisseaux sanguins si cette mutation se produisait dans des cellules endothéliales tumorales.

Des études *in vivo* sont aussi nécessaires pour étudier les effets physiologiques d'une baisse d'ubiquitination, et donc de la régulation à la baisse du VEGFR-2. Des adénovirus exprimant le mutant Y1319F du VEGFR- 2 pourraient être injectés dans un modèle animal comme la souris. Dans des souris avec un phénotype ischémique, cette approche pourrait être utilisée pour voir si les cellules endothéliales produisent une réponse angiogénique plus prononcée que dans des cellules infectées avec des virus transportant un vecteur vide. Une plus forte réponse angiogénique chez les souris injectées avec le mutant Y1319F, pourrait ouvrir une voie au développement d'une thérapie alternative pour le traitement de l'ischémie. Afin d'évaluer plus en profondeur les effets physiologiques du mutant Y1319F,

des souris ‘Knock-In’ pourraient être générées pour observer l’impact de l’expression de ce mutant dans le développement vasculaire embryonnaire, et aussi à l’âge adulte pour ainsi observer son rôle dans des processus angiogéniques. Dans le développement embryonnaire, nous pouvons nous attendre à observer une angiogenèse dérégulée qui pourrait même entraîner la mort des embryons. Des graves conditions pathologiques pendant la croissance, ou une augmentation de la croissance et la survie de tumeurs, pourraient être des conséquences du manque de modulation de l’angiogenèse à l’âge adulte des souris.

## 6 Conclusion

En résumé, un modèle du processus de régulation de la signalisation du VEGFR-2 par l'ubiquitination peut être établi en se basant sur les résultats de cette étude. Premièrement, la liaison du ligand VEGF induit une dimérisation du récepteur VEGFR-2. Suite à cette dimérisation, le domaine catalytique du récepteur utilise l'ATP pour induire son autophosphorylation sur différents résidus tyrosines du domaine C-terminal du récepteur. La phosphorylation de ces résidus tyrosines, tel que discuté, crée des sites d'ancrage et d'activation pour des protéines impliquées dans différents processus cellulaires tel que la prolifération, la survie cellulaire, la migration, etc.

Une des façons pour atténuer la signalisation du VEGFR-2 implique la multi-ubiquitination du récepteur, ce qui le mène aux différentes voies de dégradation, principalement dans les lysosomes et alternativement le protéasome. Notre étude démontre que la phosphorylation du résidu tyrosine 1319 sert de site d'ancrage pour l'association de c-Cbl au VEGFR-2, et par conséquent elle est essentielle pour l'ubiquitination du récepteur. Ce modèle nous aide à mieux comprendre comment, au niveau intracellulaire, la régulation de la signalisation du VEGFR-2 se déroule.

## 7 Bibliographie

1. Ejaz, S., et al., *Vascular and morphogenetic abnormalities associated with exposure of cigarette smoke condensate during chicken and murine embryogenesis*. Biomed Environ Sci, 2010. **23**(4): p. 305-11.
2. Carmeliet, P., *Angiogenesis in health and disease*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 653-60.
3. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
4. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
5. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
6. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 685-93.
7. Ferrara, N. and R.S. Kerbel, *Angiogenesis as a therapeutic target*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 967-74.
8. Gerhardt, H., et al., *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1163-77.
9. Hughes, C.C., *Endothelial-stromal interactions in angiogenesis*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(3): p. 204-9.
10. Davis, G.E. and D.R. Senger, *Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization*. Circ Res, 2005. **97**(11): p. 1093-107.
11. Iruela-Arispe, M.L. and G.E. Davis, *Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation*. Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 222-31.
12. Hellstrom, M., et al., *Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis*. J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. 543-53.
13. Folkman, J. and P.A. D'Amore, *Blood vessel formation: what is its molecular basis?* Cell, 1996. **87**(7): p. 1153-5.
14. Eklund, L. and B.R. Olsen, *Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling*. Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 630-41.
15. Darland, D.C. and P.A. D'Amore, *Blood vessel maturation: vascular development comes of age*. J Clin Invest, 1999. **103**(2): p. 157-8.
16. Nagy, J.A., et al., *Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know?* Br J Cancer, 2009. **100**(6): p. 865-9.
17. Jain, R.K., *Delivery of molecular medicine to solid tumors*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1079-80.
18. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
19. Liao, D. and R.S. Johnson, *Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(2): p. 281-90.

20. Gerber, H.P., et al., *VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 954-8.
21. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
22. Gerber, H.P. and N. Ferrara, *The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis*. J Mol Med, 2003. **81**(1): p. 20-31.
23. Smolich, B.D., et al., *The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1413-21.
24. Patz, A., *Studies on retinal neovascularization. Friedenwald Lecture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1980. **19**(10): p. 1133-8.
25. Detmar, M., et al., *Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(1): p. 44-50.
26. Cramer, T., et al., *HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation*. Cell, 2003. **112**(5): p. 645-57.
27. Reinders, M.E., et al., *Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1655-65.
28. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. Nat Med, 2003. **9**(6): p. 669-76.
29. Ogawa, S., et al., *A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain*. J Biol Chem, 1998. **273**(47): p. 31273-82.
30. Suto, K., et al., *Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1*. J Biol Chem, 2005. **280**(3): p. 2126-31.
31. Hicklin, D.J. and L.M. Ellis, *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. J Clin Oncol, 2005. **23**(5): p. 1011-27.
32. Mattei, M.G., et al., *Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively*. Genomics, 1996. **32**(1): p. 168-9.
33. Ferrara, N., *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med, 1999. **77**(7): p. 527-43.
34. Carmeliet, P., et al., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
35. Inoue, M., et al., *VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis*. Cancer Cell, 2002. **1**(2): p. 193-202.
36. Kim, K.J., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 841-4.
37. Holmes, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition*. Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2003-12.



38. Paavonen, K., et al., *Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively*. Circulation, 1996. **93**(6): p. 1079-82.
39. Bellomo, D., et al., *Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia*. Circ Res, 2000. **86**(2): p. E29-35.
40. Sun, Y., et al., *Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(10): p. 1146-52.
41. Maglione, D., et al., *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9267-71.
42. Roy, H., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of placental growth factor to perivascular tissue induces angiogenesis via upregulation of the expression of endogenous vascular endothelial growth factor-A*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(12): p. 1422-8.
43. Luttun, A., et al., *Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 831-40.
44. Jenkins, N.A., et al., *Mapping of the gene for vascular endothelial growth factor-D in mouse and man to the X chromosome*. Chromosome Res, 1997. **5**(7): p. 502-5.
45. Karkkainen, M.J., et al., *Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 74-80.
46. Skobe, M., et al., *Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 192-8.
47. He, Y., et al., *Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(11): p. 819-25.
48. Chen, Z., et al., *Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival*. Cancer Res, 2005. **65**(19): p. 9004-11.
49. Terman, B.I., et al., *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(3): p. 1579-86.
50. Matthews, W., et al., *A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9026-30.
51. Kaipainen, A., et al., *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3566-70.
52. de Vries, C., et al., *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. Science, 1992. **255**(5047): p. 989-91.

53. Fong, G.H., et al., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
54. Waltenberger, J., et al., *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26988-95.
55. Dunk, C. and A. Ahmed, *Vascular endothelial growth factor receptor-2-mediated mitogenesis is negatively regulated by vascular endothelial growth factor receptor-1 in tumor epithelial cells*. Am J Pathol, 2001. **158**(1): p. 265-73.
56. Hiratsuka, S., et al., *Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1207-13.
57. Clauss, M., et al., *The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17629-34.
58. Lyden, D., et al., *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1194-201.
59. Chen, W.S., R.P. Kitson, and R.H. Goldfarb, *Modulation of human NK cell lines by vascular endothelial growth factor and receptor VEGFR-1 (FLT-1)*. In Vivo, 2002. **16**(6): p. 439-45.
60. Shalaby, F., et al., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
61. Dvorak, H.F., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy*. J Clin Oncol, 2002. **20**(21): p. 4368-80.
62. Millauer, B., et al., *High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis*. Cell, 1993. **72**(6): p. 835-46.
63. Roskoski, R., Jr., *VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **375**(3): p. 287-91.
64. Parast, C.V., et al., *Characterization and kinetic mechanism of catalytic domain of human vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase (VEGFR2 TK), a key enzyme in angiogenesis*. Biochemistry, 1998. **37**(47): p. 16788-801.
65. Dougher-Vermazen, M., et al., *Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(1): p. 728-38.
66. Cunningham, S.A., et al., *Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(3): p. 635-9.
67. Takahashi, T., et al., *A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2768-78.
68. Wu, L.W., et al., *VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6059-62.

69. Kendall, R.L., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6453-60.
70. Blanes, M.G., et al., *Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(14): p. 10660-9.
71. Veikkola, T., et al., *Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors*. Cancer Res, 2000. **60**(2): p. 203-12.
72. Abedi, H. and I. Zachary, *Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(24): p. 15442-51.
73. Autiero, M., et al., *Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 936-43.
74. Carmeliet, P., et al., *Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 575-83.
75. McCarty, M.F., et al., *ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, inhibits orthotopic growth and angiogenesis of gastric cancer*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(9): p. 1041-8.
76. Inoue, K., et al., *Treatment of human metastatic transitional cell carcinoma of the bladder in a murine model with the anti-vascular endothelial growth factor receptor monoclonal antibody DC101 and paclitaxel*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(7): p. 2635-43.
77. Aprelikova, O., et al., *FLT4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter*. Cancer Res, 1992. **52**(3): p. 746-8.
78. Valtola, R., et al., *VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer*. Am J Pathol, 1999. **154**(5): p. 1381-90.
79. Paavonen, K., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1499-504.
80. Matsumura, K., et al., *Modulation of VEGFR-2-mediated endothelial-cell activity by VEGF-C/VEGFR-3*. Blood, 2003. **101**(4): p. 1367-74.
81. Tsurusaki, T., et al., *Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis*. Br J Cancer, 1999. **80**(1-2): p. 309-13.
82. Roberts, N., et al., *Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2*. Cancer Res, 2006. **66**(5): p. 2650-7.
83. Hoshida, T., et al., *Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 8065-75.

84. Soker, S., et al., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*. Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
85. Kawasaki, T., et al., *A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation*. Development, 1999. **126**(21): p. 4895-902.
86. Takashima, S., et al., *Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3657-62.
87. Serini, G., D. Valdembrì, and F. Bussolino, *Integrins and angiogenesis: a sticky business*. Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 651-8.
88. Borges, E., Y. Jan, and E. Ruoslahti, *Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain*. J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 39867-73.
89. Hong, Y.K., et al., *VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins*. FASEB J, 2004. **18**(10): p. 1111-3.
90. Dejana, E., *Endothelial cell-cell junctions: happy together*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(4): p. 261-70.
91. Carmeliet, P., et al., *Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis*. Cell, 1999. **98**(2): p. 147-57.
92. Zanetti, A., et al., *Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(4): p. 617-22.
93. Gavard, J. and J.S. Gutkind, *VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1223-34.
94. Abu-Soud, H.M., et al., *Electron transfer in the nitric-oxide synthases. Characterization of L-arginine analogs that block heme iron reduction*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32318-26.
95. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
96. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
97. Maree, A., et al., *Role of nitric oxide in glycerol-induced acute renal failure in rats*. Nephrol Dial Transplant, 1994. **9 Suppl 4**: p. 78-81.
98. Tomita, H., et al., *Inhibition of NO synthesis induces inflammatory changes and monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat hearts and vessels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(9): p. 1456-64.
99. Bauer, P.M., et al., *Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14841-9.

100. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
101. Fleming, I. and R. Busse, *Signal transduction of eNOS activation*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 532-41.
102. Kou, R., D. Greif, and T. Michel, *Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29669-73.
103. Wiley, H.S. and P.M. Burke, *Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking*. Traffic, 2001. **2**(1): p. 12-8.
104. Peschard, P. and M. Park, *Escape from Cbl-mediated downregulation: a recurrent theme for oncogenic deregulation of receptor tyrosine kinases*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 519-23.
105. Galcheva-Gargova, Z., S.J. Theroux, and R.J. Davis, *The epidermal growth factor receptor is covalently linked to ubiquitin*. Oncogene, 1995. **11**(12): p. 2649-55.
106. Mori, S., C.H. Heldin, and L. Claesson-Welsh, *Ligand-induced polyubiquitination of the platelet-derived growth factor beta-receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(9): p. 6429-34.
107. Hershko, A., et al., *Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown*. J Biol Chem, 1983. **258**(13): p. 8206-14.
108. Varadan, R., et al., *Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7055-63.
109. Woelk, T., et al., *The ubiquitination code: a signalling problem*. Cell Div, 2007. **2**: p. 11.
110. Spence, J., et al., *Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain*. Cell, 2000. **102**(1): p. 67-76.
111. Hofmann, R.M. and C.M. Pickart, *Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair*. Cell, 1999. **96**(5): p. 645-53.
112. Deng, L., et al., *Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. Cell, 2000. **103**(2): p. 351-61.
113. Kaiser, P., et al., *Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4*. Cell, 2000. **102**(3): p. 303-14.
114. Hicke, L. and H. Riezman, *Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis*. Cell, 1996. **84**(2): p. 277-87.
115. Galan, J.M. and R. Haguener-Tsapis, *Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein*. EMBO J, 1997. **16**(19): p. 5847-54.
116. Sigismund, S., et al., *Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2760-5.

117. Clague, M.J., *Membrane transport: a coat for ubiquitin*. Curr Biol, 2002. **12**(15): p. R529-31.
118. Katzmann, D.J., G. Odorizzi, and S.D. Emr, *Receptor downregulation and multivesicular-body sorting*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 893-905.
119. Bowers, K., et al., *Degradation of endocytosed epidermal growth factor and virally ubiquitinated major histocompatibility complex class I is independent of mammalian ESCRTII*. J Biol Chem, 2006. **281**(8): p. 5094-105.
120. Schmitz, C., A. Kinner, and R. Kolling, *The deubiquitinating enzyme Ubp1 affects sorting of the ATP-binding cassette-transporter Ste6 in the endocytic pathway*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(3): p. 1319-29.
121. von Zastrow, M. and A. Sorkin, *Signaling on the endocytic pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(4): p. 436-45.
122. Lampugnani, M.G., et al., *Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments*. J Cell Biol, 2006. **174**(4): p. 593-604.
123. Le Boeuf, F., F. Houle, and J. Huot, *Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 39175-85.
124. Jopling, H.M., et al., *Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(7): p. 1119-24.
125. Singh, A.J., et al., *The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(4): p. 2106-18.
126. Laney, J.D. and M. Hochstrasser, *Substrate targeting in the ubiquitin system*. Cell, 1999. **97**(4): p. 427-30.
127. Huibregtse, J.M., et al., *A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 5249.
128. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11364-9.
129. Nau, M.M. and S. Lipkowitz, *Comparative genomic organization of the cbl genes*. Gene, 2003. **308**: p. 103-13.
130. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 294-307.
131. Levkowitz, G., et al., *Coupling of the c-Cbl protooncogene product to ErbB-1/EGF-receptor but not to other ErbB proteins*. Oncogene, 1996. **12**(5): p. 1117-25.
132. Tsygankov, A.Y., et al., *Beyond the RING: CBL proteins as multivalent adapters*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6382-402.
133. Robertson, H., et al., *A Drosophila analogue of v-Cbl is a dominant-negative oncoprotein in vivo*. Oncogene, 2000. **19**(29): p. 3299-308.
134. Acconcia, F., S. Sigismund, and S. Polo, *Ubiquitin in trafficking: the network at work*. Exp Cell Res, 2009. **315**(9): p. 1610-8.
135. Langdon, W.Y., et al., *The c-cbl proto-oncogene is preferentially expressed in thymus and testis tissue and encodes a nuclear protein*. J Virol, 1989. **63**(12): p. 5420-4.

136. Keane, M.M., et al., *cbl-3: a new mammalian cbl family protein*. *Oncogene*, 1999. **18**(22): p. 3365-75.
137. Blake, T.J., et al., *The sequences of the human and mouse c-cbl proto-oncogenes show v-cbl was generated by a large truncation encompassing a proline-rich domain and a leucine zipper-like motif*. *Oncogene*, 1991. **6**(4): p. 653-7.
138. Langdon, W.Y., K.G. Heath, and T.J. Blake, *The localization of the products of the c-cbl and v-cbl oncogenes during mitosis and transformation*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992. **182**: p. 467-74.
139. Wong, E.S., et al., *Sprouty2 attenuates epidermal growth factor receptor ubiquitylation and endocytosis, and consequently enhances Ras/ERK signalling*. *EMBO J*, 2002. **21**(18): p. 4796-808.
140. Duval, M., et al., *Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(22): p. 20091-7.
141. Singh, A.J., et al., *A critical role for the E3-ligase activity of c-Cbl in VEGFR-2-mediated PLCgamma1 activation and angiogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(13): p. 5413-8.
142. Ewan, L.C., et al., *Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells*. *Traffic*, 2006. **7**(9): p. 1270-82.
143. Kobayashi, S., et al., *The c-Cbl/CD2AP complex regulates VEGF-induced endocytosis and degradation of Flt-1 (VEGFR-1)*. *FASEB J*, 2004. **18**(7): p. 929-31.
144. Ng, C., et al., *Structural basis for a novel intrapeptidyl H-bond and reverse binding of c-Cbl-TKB domain substrates*. *EMBO J*, 2008. **27**(5): p. 804-16.
145. Abella, J.V. and M. Park, *Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **296**(5): p. E973-84.
146. Frederick, L., et al., *Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas*. *Cancer Res*, 2000. **60**(5): p. 1383-7.
147. Han, W., et al., *Hypophosphorylation of residue Y1045 leads to defective downregulation of EGFRvIII*. *Cancer Biol Ther*, 2006. **5**(10): p. 1361-8.
148. Herbst, R., S. Munemitsu, and A. Ullrich, *Oncogenic activation of v-kit involves deletion of a putative tyrosine-substrate interaction site*. *Oncogene*, 1995. **10**(2): p. 369-79.
149. Roussel, M.F., et al., *A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms proto-oncogene product) activates its transforming potential*. *Cell*, 1988. **55**(6): p. 979-88.